

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES AMINO-DERIVES CANCERIGENES TOXICOLOGIE DE LA BENZIDINE

THÈSE

POUR L'OBTENTION
DU GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Présentée et soutenue publiquement le 20 mars 1958

par

Roger PROST

Pharmacien

JURY

MM. FABRE, *Doyen, Membre de l'Institut*, Président
TRUHAUT, Professeur
QUEVAUVILLER, Professeur

PARIS
IMPRIMERIE R. FOULON
29, RUE DEPARCIEUX, 29
1958

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES AMINO-DERIVES CANCERIGENES TOXICOLOGIE DE LA BENZIDINE

THÈSE

POUR L'OBTENTION
DU GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Présentée et soutenue publiquement le 20 mars 1958

par

Roger PROST

Pharmacien

JURY

MM. FABRE, *Doyen, Membre de l'Institut*, Président

TRUHAUT, Professeur

QUEVAUVILLER, Professeur

PARIS
IMPRIMERIE R. FOULON
29, RUE DEPARCIEUX, 29
1958

Personnel de la Faculté de Pharmacie de Paris

ADMINISTRATION

MM. René FABRE, Doyen, C. ✱, ☉ C., *Membre de l'Institut*

R. DELABY, Assesseur, O. ✱, ☉ I.

G. CUVIER, Secrétaire général, ✱, ☉ I.

MM. JEANDEL, Secrétaire, ☉ I. — QUILLIOT, Rédacteur

Mme ESPINASSE, Rédactrice, ☉ I. — Mlle DENNY, Rédactrice,

Mlle BERIL, Rédactrice — Mme CELLIER, Commis, ☉ A.

Mlle MORIN, Commis, ☉ A. — Mlle BIDEAU, Commis — Mme CARON, Commis

PROFESSEURS

MM. FABRE, Membre de l'Institut, C. ✱, ☉ C.

DELABY, O. ✱, ☉ I.

DOMANGE, ✱, ☉ I.

CRETE, ✱, ☉ I.

JANOT, ✱, ☉ I.

VALETTE, ✱, ☉ I.

BEDEL, ✱, ☉ I.

PARIS, ✱, ☉ I.

GUILLOT, ✱, ☉ I.

GAUTIER, ✱, ☉ I.

Mlle LAMBIN, ✱, ☉ I.

MM. RAOUL, ☉ I.

COURTOIS, ✱, ☉ I.

N... ..

N... ..

MORETTE, ✱, ☉ I.

TRUHAUT, ✱, ☉ I.

CAVIER, ☉ I.

MOREAU, ✱, ☉ I.

GUY, ☉ A.

GERMAN, ☉ A.

Toxicologie

Pharmacie chimique

Chimie minérale

Botanique

Pharmacie galénique

Pharmacodynamie

Législation, Déontologie et Histoire de
la Pharmacie

Histoire naturelle des médicaments sim-
ples d'origine végétale

Physique

Chimie analytique

Microbiologie

Zoologie appliquée

Chimie biologique

Hygiène et Hydrologie

Chimie organique

Professeur à titre personnel

Professeur à titre personnel

Professeur à titre personnel

Professeur sans chaire

Professeur sans chaire

Professeur sans chaire

Doyen honoraire : M. RADAIS, C. ✱, ☉ I.



PROFESSEURS HONORAIRES

MM. DELEPINE, C. ✱, ☉ I. — LEBEAU, C. ✱, ☉ I.
Membres de l'Institut

HERISSEY, C. ✱, ☉ I. — LAUNOY, O. ✱, ☉ I. — FLEURY, O. ✱, ☉ I.
 MASCRE, O. ✱, ☉ I. — PICON, O. ✱, ☉ I.

MAITRES DE CONFERENCES

MM. PIETTE, ☉ A.	Sciences naturelles
QUEVAUVILLER, ☉ A.	Sciences naturelles
DAMIENS	Sciences physiques et chimiques
DEYSSON, ☉ A.	Sciences naturelles
MALANGEAU, ☉ A.	Sciences appliquées
FLAHAUT	Sciences physiques et chimiques
J. RENAULT	Sciences physiques et chimiques

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM. BORY	Sérologie
BOURDON	Chimie analytique (1 ^{re} année)
CORRIEZ, ☉ I.	Physique
DESVIGNES	Microbiologie
HARISPE, ☉ A.	Chimie générale et pharmaceutique
LECLERC	Chimie biologique
Mlle LONGUEVALLE, ☉ I.	Service des examens de Chimie
MM. MANGEOT, ☉ A.	Chimie (4 ^e année)
PELLERIN	Chimie analytique (2 ^e /3 ^e année)
H. RENAULT, ☉ A.	Chimie analytique (2 ^e /3 ^e année)
SAVEL	Parasitologie
Mlle ROLLEN, ✱, ☉ A.	Biologie végétale

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

MM. GOUTAREL, ☉ A.	Chef de Travaux de Pharmacotechnie galénique
Mlle MORIN	Chef de Travaux de Pharmacodynamie
M. LUSINCHI	Chef de Travaux de Pharmacotechnie chimique

BIBLIOTHEQUE

Conservateur : M. GARNIER, ✱, ☉ I.

Bibliothécaires : Mlle LAVAUD, ☉ I.

Mmes DESGRIPPES, ☉ A. — KREHMER, ☉ A.

A MON PÈRE

Chevalier de la Légion d'Honneur

A MA MÈRE

*En faible gage de ma reconnaissance et
de mon affection.*

A MA FEMME

*Dont l'affectueux dévouement m'a été
d'un précieux concours.*

A MA FAMILLE

A TOUS MES AMIS

Je dédie ce travail.

A NOTRE MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE DOYEN RENÉ FABRE

Membre de l'Institut

Membre de l'Académie de Médecine

Professeur de Toxicologie

à la Faculté de Pharmacie de Paris et à l'Institut d'Hygiène Industrielle
et de Médecine du Travail à la Faculté de Médecine de Paris

Pharmacien en Chef du Groupe Hospitalier Necker - Enfants Malades

Commandeur de la Légion d'Honneur

*En témoignage de notre très respectueuse
reconnaissance pour l'honneur d'avoir été
accueilli dans son laboratoire et avec l'ex-
pression de notre profond dévouement.*

A NOTRE MAITRE

MONSIEUR LE PROFESSEUR RENÉ TRUHAUT

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris
Chef des Recherches de Chimiothérapie Anticancéreuse
à l'Institut Gustave Roussy

Pharmacien en Chef de l'Hôpital Psychiatrique de Ville-Evrard
Chevalier de la Légion d'Honneur

*Qui nous a confié le sujet de cette thèse
et en a dirigé l'exécution et la rédaction.*

*A qui nous devons l'essentiel de notre
formation scientifique.*

*En témoignage de notre respectueux atta-
chement et de notre très profonde gratitude.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR ANDRÉ QUEVAUVILLER

Professeur d'Hygiène à la Faculté de Pharmacie de Paris
Inspecteur des Etablissements Classés

*Qui a bien voulu accepter de faire partie
de notre jury de thèse.*

*En témoignage de notre respectueuse
reconnaissance.*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INTRODUCTION

Avec le développement des manufactures de matières colorantes, l'attention des médecins du travail et des hygiénistes a été attirée par la fréquence des *cancers vésicaux* chez les ouvriers exposés à la manipulation prolongée de certaines bases aminées et, en particulier, des amines primaires aromatiques servant à la fabrication des *azoïques*.

Ce type de cancer chimique occupe une place importante parmi les *cancers professionnels*. Les premières observations sont dues au chirurgien allemand REHN [139] qui, en 1895, signala au Congrès de Chirurgie de Berlin, la découverte de 3 cas de cancer de la vessie chez des ouvriers affectés à la fabrication de la fuchsine à partir d'huile d'aniline pour rouge (mélange d'aniline, d'o.toluidine et de p. toluidine). A la suite de ces constatations, REHN effectua toute une série d'enquêtes dans les usines de matières colorantes synthétiques de Rhénanie et publia, en 1906, 33 nouveaux cas de cancers vésicaux. Ces observations préliminaires furent confirmées et complétées par toute une série d'autres émanant de divers pays du monde intéressés à la fabrication des matières colorantes (Allemagne, Suisse, Grande-Bretagne, Italie, U.S.A., France, etc.).

En France, ont été déclarés à l'Inspection du Travail comme cancers vésicaux professionnels imputables aux amines aromatiques, de 1948 à 1956 :

1948

— Aniline	3 cas	{	13 déclarations
— Toluidine	2 «		
— Benzidine	4 «		
— β -Naphtylamine	4 «		

1949

— Benzidine	1 cas	{	5 déclarations
— β -Naphtylamine	3 «		
— Aminophénol	1 «		

1950

— Aniline	2 cas	{	5 déclarations
— Benzidine	3 «		

1951

— Aniline	1 cas	}	8 déclarations
— Phénylhydrazine	1 «		
— Toluidine	1 «		
— Benzidine	3 «		
— β -Naphtylamine	2 «		

1952

— Aniline	4 cas	}	15 déclarations
— Toluidine	3 «		
— Benzidine	3 «		
— β -Naphtylamine	5 «		

1953

— Toluidine	1 cas	}	7 déclarations
— Benzidine	2 «		
— β -Naphtylamine	4 «		

1954

— Aniline	3 cas	}	7 déclarations
— Toluidine	1 «		
— β -Naphtylamine	2 «		
— Benzidine	1 «		

1955

— Benzidine	1 cas	1 déclaration
-------------------	-------	---------------

1956

— β -Naphtylamine	1 cas	}	3 déclarations
— Benzidine	2 «		

Soit au total : 64 déclarations (*)

Le nombre réel est d'ailleurs sûrement plus élevé, car il est certain qu'en dehors des cas déclarés, il existe des cas inconnus ou non diagnostiqués. En effet, dans une statistique récente concernant les taux de mortalité due aux cancers de la vessie, dans douze pays, CLEM-MESEN, NIELSEN et LOCKWOOD [42] citent des chiffres impressionnants et souvent d'autant plus élevés que les pays envisagés possèdent une industrie chimique plus développée : 3.714 décès parmi les hommes

(*) Nous tenons tout particulièrement à remercier M. le Docteur GILLON, Médecin-Inspecteur Général du Travail et de la Main-d'Œuvre au « Secrétariat d'Etat au Travail et à la Sécurité Sociale », pour avoir bien voulu nous communiquer ces statistiques.

et 1.543 parmi les femmes pour une période de deux ans (1952-1953) en Grande-Bretagne contre 348 et 263 pour la même période au Japon.

À l'origine, il fut difficile de découvrir parmi les nombreux produits utilisés (aniline, toluidines, α ou β -naphtylamines, benzidine, o-tolidine, etc.) les vrais agents responsables des tumeurs de la vessie.

On a longtemps incriminé l'aniline et c'est la raison pour laquelle on donnait à ce cancer professionnel le nom de « cancer des teinturiers d'aniline », ou de « cancer anilinique ». Mais, peu à peu, grâce à de nombreuses observations cliniques, grâce aussi à diverses expérimentations effectuées sur différentes espèces animales [163 - 164 - 168], grâce enfin aux résultats acquis par la mise en œuvre de mesures de prophylaxie, on a pu démontrer avec certitude que la β -naphtylamine et la benzidine, et aussi l'amino-4-biphényle ou xénylamine, jouaient un rôle essentiel dans l'étiologie des amino-tumeurs vésicales.



β Naphthylamine



Benzidine

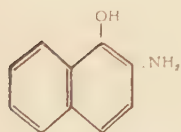


Xénylamine

La β -naphtylamine a fait l'objet de recherches très poussées : SCHAR [149], PERLMANN et STAEHLER [132], HUEPER, WILLEY et WOLFE [90] et Mrs BONSER [25] ont confirmé, du point de vue

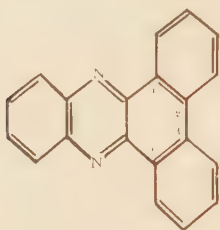
expérimental, le rôle cancérigène de cette amine en produisant des tumeurs de la vessie par administration prolongée, par voie buccale, du produit industriel chez l'animal. Plus récemment, Mrs BONSER, CLAYSON et coll. [27] ont soutenu que le véritable agent cancérigène ne serait pas la β -naphtylamine, mais son dérivé hydroxylé en position 1, qui est un des produits

de transformation métabolique que l'on retrouve dans les urines d'animaux traités.

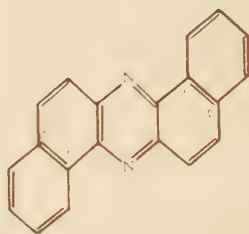


Plus récemment encore, RUDALI, CHALVET et WINTERNYTZ [140], accordant, à la suite d'HAMILTON [79], de CASE et PARSON [36], un rôle primordial aux impuretés contenues dans les amines industrielles, ont provoqué la cancérisation de la vessie chez le Rat, à la suite

d'introduction, par cystostomie dans la cavité vésicale de l'animal anesthésié, de dibenzophénazines qui constituent les impuretés des naphtylamines.



Dibenzo - 1, 2, 3, 4 phénazine



Dibenzo - 1, 2, 5, 6 phénazine

Chez 19 animaux traités par la dibenzo-1, 2, 3, 4 phénazine, 7 portaient des tumeurs multiples de la vessie. Chez 29 autres soumis à la dibenzo-1, 2, 5, 6 phénazine, 10 présentèrent des tumeurs.

L'étude de l'action cancérigène de la β -naphtylamine a donc déjà donné des résultats théoriques et pratiques incontestables.

Quant à la xénylamine, elle a été expérimentée par WALPOLE et WILLIAMS [179 bis]. Chez le Rat, les auteurs ont obtenu des cancers diversement localisés (glande mammaire, foie, intestin) à la suite d'injections répétées de xénylamine en solution dans l'huile d'arachide. Chez le Chien soumis à une intoxication « per os », pendant plus de deux ans, ils ont découvert, trente-trois mois après le début de l'expérience, des tumeurs malignes de la vessie à un stade d'évolution avancé. Il n'est pas sans intérêt de signaler que la xénylamine a été découverte dans les résidus de distillation de l'aniline pour rouge, ce qui permet peut-être d'expliquer les observations de tumeurs vésicales chez les ouvriers manipulant cette dernière.

En revanche, les données concernant la benzidine sont beaucoup plus rares, spécialement sur le plan expérimental.

C'est la raison pour laquelle, l'« Institut National de Sécurité pour la Prévention des Accidents du Travail et des Maladies Professionnelles » nous a demandé d'effectuer une étude d'ensemble sur la toxicologie de la benzidine et sur son rôle dans l'étiologie des cancers vésicaux professionnels.

Notre travail comporte cinq parties :

- Dans une *première partie*, nous exposerons les principales données physiques, chimiques et biologiques concernant la benzidine ;

nous en profiterons pour faire le point de l'état actuel de nos connaissances sur les propriétés cancérigènes de cette amine. Nous envisagerons successivement les conditions dans lesquelles ces propriétés peuvent se manifester. Cet exposé nous conduira à examiner les formes de pénétration du toxique et les doses actives, en insistant sur la notion de *temps de latence*, les formes cliniques des proliférations tumorales ainsi que leurs principales caractéristiques histologiques. Enfin, après un aperçu des traitements préconisés pour combattre le développement des formations malignes, nous terminerons en présentant les données fondamentales de prophylaxie et les données essentielles de la législation régissant l'emploi du produit, en particulier dans les usines de matières colorantes.

- Dans une *deuxième partie*, d'ordre analytique, après l'examen des méthodes physiques ou chimiques antérieurement proposées pour la caractérisation ou le dosage de la benzidine, nous décrirons la technique que nous avons établie, basée sur la réaction de MARSHALL [116], diazotation suivie d'une copulation avec le chlorhydrate de N-naphtyl-diéthyl-propylène-diamine (dite amine de Tréfouel). Nous indiquerons ensuite les conditions d'application de cette méthode au dosage de l'amine dans les atmosphères et les milieux biologiques. Au cours de cette deuxième partie, nous mentionnerons les méthodes chromatographiques utilisées parallèlement aux méthodes chimiques par différents auteurs pour différencier, dans des mélanges complexes, la benzidine des autres amines industrielles ou de ses homologues.

- La *troisième partie* concernera les recherches que nous avons effectuées au cours d'intoxications expérimentales aiguës, subaiguës et chroniques, chez différentes espèces animales. Nous avons étudié, entre autres, la répartition du toxique dans les différents organes et, grâce à une méthode de « centrifugation différentielle », nous avons essayé de localiser le toxique au niveau des structures cellulaires isolées : noyau, mitochondries, microsomes et cytoplasme.

- Dans la *quatrième partie*, nous examinerons un certain nombre d'effets biologiques de l'amine aromatique, en particulier son action sur les éléments figurés du sang, sur le pigment sanguin, son influence sur la respiration de divers tissus et, enfin, les altérations histologiques qu'elle provoque au niveau de certains organes.

- Pour terminer, étant donnée l'importance supposée des transformations métaboliques dans les modalités et les mécanismes d'action

cancérigène vésicale de la benzidine, nous avons consacré la *cinquième et dernière partie* de notre travail à l'étude de ces transformations. Le problème est d'un grand intérêt, puisque, ainsi que nous l'avons rappelé, dans le cas de la β -naphtylamine, on incrimine en général dans la production des cancers vésicaux l'amino-2-naphtol-1, formé dans l'organisme à partir de l'amine et s'éliminant par l'urine. Nous avons été ainsi amenés à mettre en œuvre les techniques de chromatographie sur papier qui nous ont permis d'isoler, soit de l'urine, soit d'homogénats d'organes d'animaux intoxiqués par la benzidine, divers métabolites dont nous discuterons ensuite l'intervention dans la transformation maligne de l'épithélium vésical. Parallèlement à cette étude *qualitative* des formes d'élimination, nous avons jugé indispensable de présenter les résultats *quantitatifs* traduisant le rythme de l'élimination de la benzidine ou de ses produits de transformation, rythme dont la connaissance est essentielle pour apprécier le temps d'exposition des récepteurs et tout spécialement des parois vésicales aux agents nocifs.

Principales données sur la Benzidine



- Généralités, préparation, propriétés
- Effets toxiques
- Etude des intoxications. Traitement et prévention

CHAPITRE PREMIER

GÉNÉRALITÉS SUR LA BENZIDINE

ZININ [190] isola la benzidine pour la première fois en 1845 en réduisant l'azobenzène par le sulfure d'ammonium. En réalité, ZININ pensait, par ce moyen, obtenir un produit direct de réduction de l'azobenzène. Mais, en purifiant le produit obtenu par l'acide sulfurique concentré, il avait provoqué sans le savoir la réaction maintenant bien connue de la « transposition benzidinique ».



HOFMANN [87] reprit en 1863 le travail de ZININ et isola un produit intermédiaire de la réaction auquel il donna le nom d'hydrazobenzol, « corps neutre ou faiblement basique qui diffère par toutes ses propriétés de la benzidine, avec laquelle il est toutefois isomère et dans laquelle on peut le transformer en le traitant simplement par les acides minéraux ». A la même époque, FITTIG [68] fixait définitivement la structure de la benzidine en préparant cette base par réduction catalytique du dinitrobiphényle en présence de chlorure de platine.

C'est en 1884, vingt-sept ans après la découverte de la première matière colorante artificielle, la MAUVÉINE, par l'Anglais PERKIN, que BOTTINGER découvrit les propriétés tinctoriales des premiers colorants dérivés de la benzidine : *Rouge Congo* et *Chrysoidine*. Ces colorants, bien que faisant suite à la liste déjà longue de ces « couleurs d'aniline » qui avaient enthousiasmé savants et industriels, apportaient une possibilité nouvelle, pour ne pas dire une révolution dans l'art de la teinture. Ils permettaient de teindre directement, *sans mordantage préalable*, la fibre de coton et, pour cette raison, on les appela colo-

rants substantifs. On comprendra aisément l'intérêt considérable de la découverte de BOTTINGER si l'on se souvient qu'à cette époque la teinture du coton était rendue longue et délicate par la nécessité d'employer des mordants difficiles à manier tels que les tanins ou certains oxydes métalliques (oxydes d'aluminium, de fer, de chrome, de cuivre, etc.). Ainsi, le travail se trouvait extrêmement simplifié, d'autant plus que ces colorants étaient eux-mêmes d'une fabrication facile.

D'autre part, le champ d'application des colorants pour coton est pratiquement illimité. D'après les statistiques, au moins 80 % des colorants fabriqués sont destinés à l'industrie textile, et, dans cette industrie, le coton constitue 54 % des textiles employés.

L'examen des différentes éditions (1888 à 1930) des tables de SCHULTZ nous montre, non seulement la progression constante des divers groupes chimiques auxquels ils se rattachent, mais aussi que les azoïques occupent de très loin la première place devant les colorants anthraquinoniques. Une conclusion analogue résulte des enquêtes effectuées en Allemagne donnant, pour la période précédant la dernière guerre, un tableau où les azoïques arrivent avec près de 4.000 marques commerciales attribuées à près de 1.300 individus chimiques.

Nous reproduisons, ci-dessous, un tableau des principaux colorants dérivés de la benzidine (1).

1) PRODUITS SYMETRIQUES

Benzidine diazotée + 2 mol. ac. naphthionique → *rouge congo*

Benzidine diazotée + 2 mol. ac. salicylique → *chrysamine*

2) PRODUITS ASYMETRIQUES

Benzidine diazotée + $\left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ mol. ac. salicylique} \\ 1 \text{ mol. ac. } \gamma \text{ (copul. acide)} \end{array} \right. \rightarrow \text{rouge direct } F$

Benzidine diazotée + $\left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ mol. ac. salicylique} \\ 1 \text{ mol. ac. } \gamma \text{ (copul. alcaline)} \end{array} \right. \rightarrow \text{brun diamine } M$

Benzidine diazotée + $\left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ mol. ac. H (copul. alcaline)} \\ 1 \text{ mol. ac. } \gamma \text{ (copul. alcaline)} \end{array} \right. \rightarrow \text{diazonoir direct } BH$

(1) Extrait du « Traité de Chimie Organique », de GRIGNARD, tome XXII, page 272.

En dehors de ces emplois comme matière première de fabrication des colorants, emplois de beaucoup les plus importants, la benzidine a été utilisée à d'autres fins.

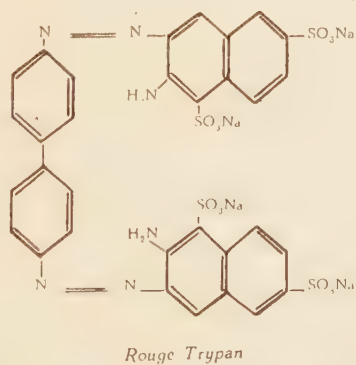
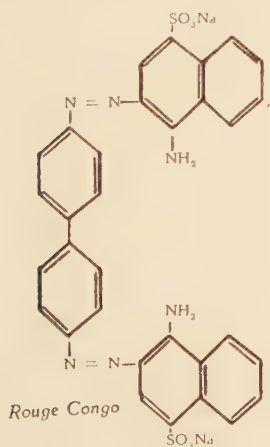
En chimie analytique, elle peut servir comme indicateur coloré dans la mesure de certains potentiels d'oxydo-réduction, méthode préconisée par KOLTHOFF [100], et, par suite de l'insolubilité de son sulfate, au dosage de l'ion SO_4^{--} (BISSEAU et CHRISTIE [23]). En raison de son oxydabilité avec production d'une matière colorante bleue, elle est, en outre, utilisée pour la détection de l'ozone ou de l'oxygène actif dégagé par divers produits dans certaines conditions ; c'est ainsi que pour caractériser et éventuellement doser l'acide cyanhydrique dans les atmosphères, on fait appel à des papiers réactifs imprégnés d'une solution d'acétate de benzidine à 1 % en présence de sulfate de cuivre, l'oxygène étant libéré suivant la réaction suivante :



Cette oxydabilité est aussi utilisée dans les réactions dites peroxydasiques de l'hémoglobine pour la caractérisation du sang dans l'urine, en chimie biologique [8], ou des taches de sang en médecine légale [44].

Parmi d'autres utilisations anciennes ou récentes plus diverses, nous noterons l'emploi, rapporté par CANDEA, DOBRESCU et CROPSIANU [35], de la benzidine comme anti-oxydant dans certains pétroles de Roumanie.

Dans le domaine thérapeutique, la benzidine est à la base de la fabrication de certains médicaments comme le Rouge Congo ou le Rouge Trypan.



Le Rouge Congo a été préconisé pour le diagnostic de la dégénérescence amyloïde ou amylose rénale. Il a été utilisé aussi contre les hémoptysies et hémorragies en général et en tant que préventif des accidents de l'hémophilie. Enfin on a pu observer de bons résultats dans des cas d'anémie pernicieuse à la suite d'injections de solution de Rouge Congo.

Le Rouge Trypan, expérimenté en 1904 par EHRLICH et SHIGA [57], s'est révélé actif sur les souris injectées par la nagana. L'utilisation de la benzidine comme matière première de préparation de ces colorants n'est pas sans importance en toxicologie, car il peut persister, dans le produit fini, une certaine quantité d'amine aromatique en tant qu'impureté.

Pour en revenir au domaine de l'hygiène industrielle qui nous intéresse plus particulièrement, c'est surtout et presque uniquement lors de la préparation de la benzidine, ou des matières colorantes qui en dérivent, que peuvent se manifester les effets nocifs de l'amine aromatique.

CHAPITRE DEUXIEME

OBTENTION DE LA BENZIDINE

Il nous a paru utile de donner à ce sujet quelques détails pour bien comprendre l'étiologie des intoxications professionnelles.

Depuis la découverte de la « transposition benzidinique », on traite l'hydrazobenzène par un acide minéral ; en fait, on réduit le nitrobenzène en milieu alcalin et on soumet le produit obtenu à l'action de l'acide chlorhydrique.

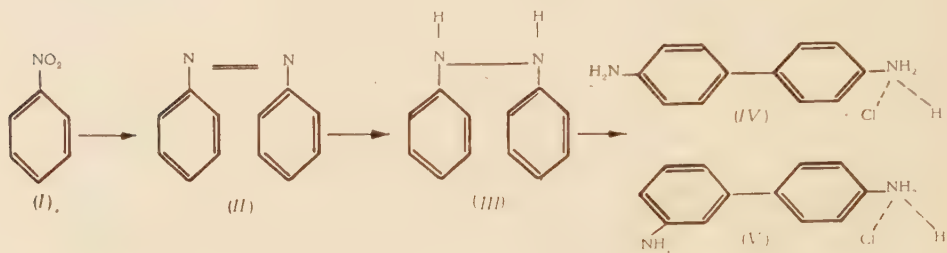
I. — PRÉPARATION DE L'HYDRAZOBENZÈNE

Dans une chaudière munie d'un réfrigérant à reflux et plongée dans un bain d'huile, le dérivé nitré (*I*) est chauffé à une température voisine de 140° avec de la lessive de soude ; on introduit alors un agent réducteur qui est en général de la tournure de fer « activée ». Au bout de quelques heures, on obtient l'azobenzène (*II*) que l'on extrait à plusieurs reprises par le benzène. Les solutions ainsi obtenues sont réunies dans un second récipient à réfrigérant et hydrogénées par la poudre de zinc en milieu alcool-sodique. La solution, filtrée sous pression réduite, se partage au repos en deux couches, la couche supérieure alcoolique contenant l'hydrazobenzène (*III*) ; ce dernier, après concentration et addition d'eau, se rassemble en une masse huileuse qui ne tarde pas à se prendre en gros cristaux.

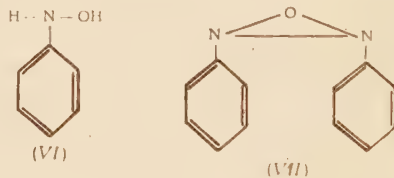
II. — PRÉPARATION PROPREMENT DITE DE LA BENZIDINE

L'hydrazobenzène est pulvérisé, puis versé dans l'acide chlorhydrique maintenu dans la glace ; après brassage de plusieurs heures et chauffage à 80°, on filtre. Dans le filtrat se trouvent, sous forme

de chlorhydrates, la benzidine (IV) et son isomère avec un NH_2 en position méta, la diphénylyne (V), dans les proportions respectives d'environ 85 % et 15 %. Pour séparer les deux diamines, on traite la solution par l'acide sulfurique et la benzidine se sépare sous forme de sulfate de benzidine, pratiquement insoluble, qui est lavé et malaxé avec une solution de carbonate de sodium. La base ainsi libérée est lavée à l'eau et purifiée par distillation sous pression réduite.



Entre le nitrobenzène et l'azobenzène, on admet la formation de produits intermédiaires qui seraient, dans un premier temps, la phénylhydroxylamine (VI) et, dans un second temps, l'azoxybenzène (VII).



Il est à noter que l'acide acétique à chaud, lui aussi, peut provoquer la « transposition benzidinique ». On obtient ainsi la diacétylbenzidine :



Divers autres modes de préparation sont utilisés : un de ceux-ci consiste à réduire le nitrobenzène par voie électrolytique et à extraire l'hydrazobenzène ainsi obtenu par le xylol avant de le traiter par un acide minéral. LOEB [111] réduit d'abord le nitrobenzène en azoxybenzène par l'électrolyse (à une température comprise entre 80° et 100°) du nitrobenzène en suspension dans une solution de soude. Lorsque la réduction est complète, on acidule par l'acide sulfurique

et on poursuit l'électrolyse, ce qui donne directement le sulfate de benzidine.

DEY, GOVINDACHAR et RAJAGOPALAN [46] obtiennent un rendement de 90 % par réduction électrolytique du nitrobenzène.

On a préconisé aussi la préparation de la benzidine à partir du biphenyle que l'on nitre et que l'on réduit ensuite. Signalons enfin la préparation d'une benzidine marquée par RAY et SOFFER [138] dans un but d'expérimentation des propriétés cancérigènes.

Il nous semble utile, avant de terminer ce chapitre, de dire un mot sur la *structure de la benzidine*. Nous n'envisagerons pas la question théorique dans toute son ampleur, mais il faut savoir que l'établissement de la formule stérique de la benzidine a été à l'origine d'abondants travaux et de très nombreuses discussions.

Rappelons simplement qu'à la formule classique qui admet les deux noyaux placés bout à bout dans un seul plan et possédant un axe commun, KAUFLEER [95] oppose une formule où les deux noyaux se trouvent, sinon dans des plans parallèles, tout au moins inclinés dans une certaine mesure l'un vers l'autre. La formule classique, défendue par TURNER et coll. [170], SIR CAR et SEN-GUPTA [157], expliquerait l'existence des isoméries optiques observées; celle de KAUFLEER, soutenue par GUGLIALMELLI, CHANUSSOT et RUIZ [77], rendrait compte de l'existence de nombreux composés cycliques parmi lesquels il faut citer le composé monophthalylé qui a fait l'objet de la plupart des travaux de ces auteurs. Il est difficile de faire un choix catégorique. ADAMS et coll. [3] ont concilié les deux théories en accordant un rôle prépondérant aux substituants qui conditionneraient l'une ou l'autre des configurations spatiales.

CHAPITRE TROISIEME

PROPRIÉTÉS DE LA BENZIDINE

PROPRIÉTÉS PHYSIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUES

La benzidine, à l'état pur, est un produit blanc qui cristallise, d'après STEINMETZ [160], dans le système monoclinique, mais la composition est variable suivant la nature du solvant dans lequel s'est opérée la cristallisation et suivant la température : les cristaux obtenus dans une solution étherée contiennent une demi-molécule d'éther de cristallisation, tandis que ceux obtenus dans une solution aqueuse contiennent une molécule d'eau si la température de cristallisation est inférieure à 60° ; au-dessus de 80°, les cristaux sont anhydres mais, peu à peu, ont tendance à se réhydrater. Ceci expliquerait peut-être les indications souvent contradictoires trouvées dans la littérature au sujet du point de fusion de la benzidine.

LE FÈVRE et TURNER [109] ont étudié, dans un article extrêmement documenté, les différentes valeurs du *point de fusion* données par divers chimistes : 118° pour HOFFMAN [87], 122° pour WALD [179], BULOW et SACHS [142], 122,5° pour BAMBERGER et LAGUTT [14], 123° pour HIRSCH [84], 127° pour KUHN et ZUMSTEIN [106], puis 127,4° obtenus au tube capillaire par PERRISS et TURNER [66]. Enfin, en 1938, KOFLER et LINDPAINTNER [99] ont mis en évidence par l'étude du point de fusion sous microscope l'existence de 5 formes cristallines et dont les points de fusion varient de 116,5° à 129°.

Du point de vue de sa solubilité, la benzidine est très peu soluble dans l'eau froide ; elle l'est davantage dans l'eau chaude. HODGMAN [85] indique une solubilité de 0,04 g pour 100 ml d'eau à 12° et de 0,94 g à 100°. Soluble dans l'alcool, la benzidine l'est aussi dans l'éther (2,2 g pour 100 ml) et les autres solvants organiques, en parti-

culier l'acétone, la méthyléthylcétone ou butanone, l'acétate d'éthyle et l'acétate d'amyle.

La benzidine *bout* entre 400° et 401° à la pression de 740 mm de mercure. Elle est *sublimable* ; nous avons utilisé cette propriété pour sa purification ; on obtient un produit parfaitement pur en opérant sous un vide voisin de 10 mm de mercure.

Sa *constante de dissociation électrolytique* a été étudiée par VELEY [174] et KUHN et ZUMSTEIN [106], et son spectre de *fluorescence* déterminé à 3.700 Å par VARTANYAN [173].

Enfin, soumise en solution à l'*électrodialyse*, la benzidine est retrouvée dans le compartiment cathodique. Nous avons personnellement utilisé cette propriété pour tenter de séparer l'amine de certains de ses métabolites.

PROPRIÉTÉS CHIMIQUES ET ANALYTIQUES

En raison de la grande réactivité de la benzidine et pour éviter des redites, nous avons jugé préférable de grouper dans un même chapitre les propriétés chimiques et les propriétés analytiques. Nous indiquerons donc, en exposant les principaux caractères chimiques, ceux qui ont permis ou permettent, non seulement d'identifier la benzidine, mais aussi de la différencier de certaines autres amines industrielles.

Nous insistons sur le fait que ces propriétés chimiques ou analytiques ne sont pas toutes appliquées ou utilisées en toxicologie. Seules quelques-unes d'entre elles, que nous signalerons au passage et que nous étudierons en détail dans la seconde partie de notre travail, ont été jusqu'à présent exploitées pour la caractérisation, la différenciation et le dosage de la benzidine dans les atmosphères des locaux de travail, dans les mélanges industriels ou dans les milieux biologiques.

Dans ce chapitre, nous nous sommes efforcés de classer les propriétés de la benzidine en considérant, d'une part, les réactions dues aux *deux noyaux* aromatiques, d'autre part, celles dues à la *fonction* NH_2 . En tête de ces dernières, en tenant compte de l'importance du caractère basique qui est conféré à la molécule par les deux groupements aminés, nous avons étudié l'action des acides minéraux et organiques sur cette diamine. Enfin, pour terminer, nous avons envisagé la formation de différents composés par suite de l'action sur la benzidine d'une série de corps chimiques assez divers.

I. — RÉACTIONS DUES AUX NOYAUX

Nous distinguons des réactions de substitution et des réactions de réduction.

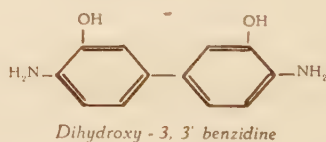
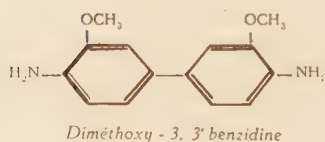
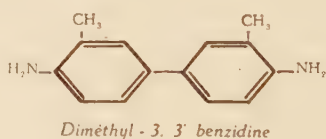
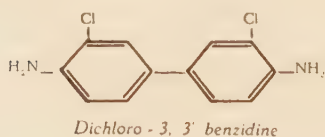
A) REACTIONS DE SUBSTITUTION

Les atomes d'hydrogène des noyaux peuvent, dans des conditions bien déterminées, sur lesquelles nous ne pouvons nous étendre ici, être remplacés par différents atomes ou radicaux chimiques ; on obtient ainsi des dérivés de la benzidine qui sont, eux aussi, utilisés comme matières premières dans l'industrie des colorants. Il est à noter que cette substitution s'opère, la plupart du temps, en position 3 et 3'.

a) Par fixation de 2 atomes de chlore, on obtient la dichloro-3, 3' benzidine ; dans des conditions analogues, on peut obtenir le dérivé dibromé.

b) Par introduction de radicaux « méthyle » et « méthoxy », on obtient respectivement l'ortholidine ou diméthyl-3, 3' benzidine, et la dianisidine ou diméthoxy-3, 3' benzidine.

c) Par introduction de groupes OH, on obtient la dihydroxy-3, 3' benzidine qui serait, d'après BAKER [10], une des formes d'élimination de la benzidine dans l'urine et manifesterait des propriétés cancérogènes ; nous reviendrons sur ce sujet.



B) REACTIONS DE REDUCTION

BALAS et SEVCENKO [12], en soumettant la benzidine à l'hydrogénation catalytique en présence de platine, ont obtenu un dérivé

correspondant à la formule $(p.NH_2-C_6H_{10})_2$, incolore, très alcalin et ne donnant plus les réactions classiques de la benzidine.

Personnellement, à la suite de l'électrodialyse prolongée de solutions de chlorhydrate de benzidine, nous n'avons pu obtenir au bout de quelques heures, tant dans le liquide cathodique que dans le liquide anodique, les réactions caractéristiques de la benzidine, ce qui nous a amené à penser que la diamine avait été hydrogénée.

II. — RÉACTIONS DUES AUX GROUPEMENTS AMINES

Nous envisagerons d'abord le caractère basique conféré à la benzidine par la présence dans sa molécule de deux groupements NH_2 , puis les réactions propres à ces deux groupements : oxydation, diazotation et acétylation.

A) CARACTERE BASIQUE DE LA BENZIDINE

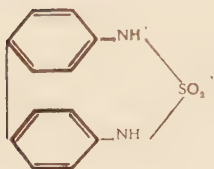
La benzidine est une base faible, comparable à cet égard à la plupart des alcaloïdes, aisément soluble dans certains acides dilués (chlorhydrique et acétique en particulier) pour donner des sels correspondants. Le caractère basique est concédé par les deux groupements NH_2 qui, comme nous l'avons dit, ont d'ailleurs leurs propres réactions. Nous envisagerons successivement l'action des acides minéraux et des acides organiques et de leurs anhydrides.

1. RÉACTION AVEC LES ACIDES MINÉRAUX

a) *L'acide chlorhydrique* dilué agit sur la benzidine pour donner un dichlorhydrate qui est un produit cristallisé, blanc, soluble dans l'eau et couramment utilisé dans les laboratoires.

b) *L'acide sulfurique* dilué donne avec la benzidine un sulfate très insoluble dans l'eau et qui a été étudié par BISSE et CRISTIE [23]. Cette insolubilité du sulfate de benzidine a été mise à profit, concurremment avec celle du sulfate de baryum, pour le dosage des sulfates. OWEN [130] a déterminé les conditions nécessaires pour la précipitation quantitative du sulfate de benzidine et précisé l'application de cette réaction au dosage des sulfates dans l'urine ; dans ce dernier cas, il est nécessaire d'éliminer les phosphates qui précipitent avec la benzidine. A la suite d'OWEN, KLEIN [97] utilise la même

réaction pour un micro-dosage de l'ion SO_4^{--} ; l'auteur isole sous forme de sulfate de benzidine des quantités d'ions SO_4^{--} comprises entre 15 et 150 microgrammes et dose la benzidine combinée par diazotation et copulation avec le chlorhydrate de N. naphtyléthylène diamine. Là encore, l'auteur insiste sur les interférences possibles des ions Cl^- en grande quantité et des ions PO_4^{--} .



Par chauffage avec l'acide sulfurique fumant, le sulfate de benzidine donne naissance à une sulfone qui correspondrait à la formule ci-dessus.

c) Les acides sélénique et tellurique ont un comportement voisin de celui de l'acide sulfurique. Pourtant DOX [52] a montré que, d'une part, la précipitation de la benzidine avec l'acide tellurique était moins complète qu'avec l'acide sulfurique (de l'ordre de 94 %) et que, d'autre part, le précipité ne se formait plus en milieu chlorhydrique dilué.

d) Quant à l'acide tungstique ou les tungstates, d'après SMITH [158], ils précipitent quantitativement la benzidine de ses sels, notamment l'acétate.

2. RÉACTIONS AVEC LES ACIDES ORGANIQUES

a) Série grasse :

α) L'acide acétique, à froid, fournit l'acétate de benzidine; à chaud, il joue, comme nous le verrons plus loin, le rôle d'agent acétylant en agissant sur les groupements aminés pour donner les dérivés mono ou di acétylés de la benzidine.

β) L'acide dichloracétique réagit sur la benzidine pour donner un sel blanc ayant un point de fusion de 203° (WHEELER et JENNINGS [185]).

Une réaction analogue a lieu avec l'acide sulfobutyrique. BACKER et BLOEMEN [7] ont montré qu'un excès de cet acide mis en présence de benzidine, en solution dans l'alcool, provoquait la formation d'un sel cristallisé, soluble dans l'eau, non fusible aux températures courantes. En quantité équimoléculaire, on obtiendrait le sel neutre qui se décompose à 200° .

γ) L'acide phosphoglycérique donne également, d'après NEUBERG et SCHUCHARDT [128], une combinaison bien cristallisée avec la benzidine.

b) *Série aromatique :*

Dans cette série, nous n'avons retenu que l'acide *p.toluène sulfonique* qui réagit avec la benzidine pour donner un sel cristallisé ayant un point de fusion compris entre 241° et 242° et qui a été utilisé par BRADSHAW et CLAYSON [30] pour caractériser la benzidine dans l'urine.

Pour terminer l'étude du caractère basique de la benzidine, il nous a semblé opportun de mentionner ici quelques corps, dits pseudo-acides, qui, sans posséder la fonction acide, se comportent comme des acides en raison de la présence, dans leur molécule, d'hydrogène mobile.

Il en est ainsi du trinitrophénol ou *acide picrique* dans lequel l'hydrogène de l'oxhydrile phénolique voit son acidité considérablement renforcée par la présence de groupes NO₂ fortement électro-négatifs et qui donne avec la benzidine un picrate jaune dont le point de fusion est de 190° (RASCANU [136]).

Ce point de fusion s'élève à 205° si la combinaison a lieu avec 2 molécules d'acide.

L'*acide dinitro-3,5 toluïque* (*ortho* ou *para*) réagit d'une façon comparable à l'acide picrique pour fournir avec les amines des dinitrotoluates à point de fusion défini : 165° pour le dinitrotoluate de benzidine pour SAH et CHUNG-HOUTIEN [144] et SAH et KWEI-HUNG-YUIN [145].

Enfin, la naphthazide en solution benzénique se comporte aussi comme un acide et a été proposée par SAH [143] comme réactif pour l'identification des amines primaires et secondaires en prenant le point de fusion des produits obtenus.

B) REACTIONS D'OXYDATION

D'après WOKER [188], dont le travail a été repris puis critiqué par MADELUNG [112], ces réactions conduiraient le plus souvent à des produits colorés différents selon le degré d'oxydation : les formes holoquinoniques seraient jaunes, les formes mériquinoniques seraient bleues. Cette oxydation peut être soit photochimique, soit purement chimique (oxygène actif, ozone, peroxydes, halogènes, métaux lourds, etc.).

1. OXYDATION PHOTOCHIMIQUE

Il est bien connu que la benzidine base exposée à l'air et à la lumière (en particulier dans des flacons de verre blanc mal obturés) s'oxyde rapidement en prenant une coloration brune. KISHORE et coll. [96] ont exposé en plein soleil des solutions à 2 % de benzidine

dans l'eau chlorhydrique ou sodique ; au bout de 94 jours, ils ont constaté la présence, dans les solutions, d'un dérivé de la phénazine qu'ils n'ont pu identifier, et qui ne serait peut-être pas sans rapport avec les constatations que nous avons déjà signalées au sujet des dibenzophénazines dans notre introduction.

L'oxydation photochimique en lumière visible et ultra-violette serait d'ailleurs activée par certains complexes métalliques, selon WATANABE [180]. D'un point de vue pratique, cette sensibilité à la lumière a été mise à profit par EDER [56] pour colorer des clichés photographiques.

2. ACTION DES PEROXYDES

Parmi les peroxydes, nous mentionnerons le peroxyde d'hydrogène qui, en présence des peroxydases du sang, donne avec la benzidine des colorations bleues ou vertes ; cette réaction, d'une très haute sensibilité, est, comme nous l'avons déjà signalé, fréquemment utilisée en médecine légale ou en chimie biologique ; d'après MALOWAN [114], l'hématine catalyserait cette réaction, laquelle peut d'ailleurs être intensifiée ou inhibée par certains sels. De même, le peroxyde de benzoyle donne, selon DE PAOLINI [131], avec des traces de benzidine en solution alcoolique un produit coloré de forme quinonique.

Suivant un principe analogue, le peroxyde de baryum en solution dans l'acide sulfurique a été utilisé par BALDÉON [13] comme réactif de toute une série de substances organiques ; nous avons noté que la benzidine *seule* donnait une coloration rouge, alors que la coloration obtenue avec la β -naphtylamine et le gaïacol était verte et celle avec le pyrogallol, la papavérine et la thébaïne était brune. Enfin, il faut citer l'action peroxydasique de la vitamine C étudiée « in vitro » sur la benzidine par BEZSSONOFF et LEROV [20].

3. ACTION DES HALOGÈNES ET DES DÉRIVÉS HALOGÉNÉS

a) Le *chlore* peut, non seulement se fixer sur le noyau comme nous l'avons déjà vu, mais il est aussi un agent efficace d'oxydation de la benzidine. Utilisé sous forme de chloramine T, il a permis à MAGUIGAN [113] d'établir une méthode de dosage colorimétrique de la benzidine qui a été reprise et améliorée par de nombreux hygiénistes et que nous étudierons en détail dans la seconde partie. Sous forme d'eau de chlore, il donne avec les solutions de benzidine (ou de ses sels), d'abord une coloration bleue (mériquinone), puis un précipité rouge, amorphe de dichloroiminobiphénoquinone (holoquinone).

b) Le *brome*, sous forme de vapeurs, a été proposé par VUKCEVIC et coll. [178] comme un réactif sûr et simple d'identification de la benzidine. On obtient des colorations variées et différentes suivant le solvant, en soumettant pendant quelques secondes aux vapeurs de brome, puis d'ammoniac, une goutte de solution de benzidine déposée sur un papier filtre.

c) *L'iode*, à l'état naissant, obtenu par le couple iodate-iodure en milieu acide, a été employé par RUZICKA [141] pour différencier certaines amines primaires aromatiques; ce réactif ne donne aucune coloration avec l'aniline, les toluidines et les xyloïdines, mais engendre une coloration « chocolat » avec les naphtylamines, noire avec les phénylènediamines et bleu avec l'orthotolidine et la benzidine.

Notons que les acides oxyhalogénés (HClO , HBrO , HIO_3) donnent des sels avec la benzidine. KRETOV [103] a signalé qu'en traitant le chlorhydrate ou l'acétate de benzidine par l'acide iodique, on obtenait un sel très insoluble et très facilement séparable sous forme d'un précipité blanc.

L'auteur a même établi sur ce principe une méthode de recherche de l'acide iodique ou des iodates, le précipité obtenu étant, soit pesé, soit traité dans un ballon de Kjeldhal en vue d'un dosage d'azote.

Sur le même plan, nous mentionnerons enfin le sel complexe formé par addition d'une solution renfermant les trois halogénures mercuriques (HgCl_2 , HgBr_2 et HgI_2) à une solution de benzidine, sel dont la formation a été préconisée par HERZOG [82] pour une détermination gravimétrique de l'amine; les résultats seraient satisfaisants, non seulement avec la benzidine, mais aussi avec l'orthotolidine.

4. ACTION DES MÉTAUX LOURDS OU DE LEURS SELS

Là encore, l'action oxydante se traduit par l'apparition de formes colorées et de complexes.

Outre l'action du permanganate et du ferricyanure de potassium, SIMON et REETZ [156] ont étudié l'action de l'ion Fe^{+++} ou de ses sels sur la benzidine; d'autre part, BYKHOVSKAYA [34] a caractérisé la benzidine par le *perchlorure de fer* en milieu alcalin, réaction dont nous reparlerons encore dans notre deuxième partie, puisqu'elle a été appliquée au dosage dans les atmosphères.

Les sels de *cuivre*, seuls ou en présence de thiocyanate alcalin, préconisés par JIMENEZ [93], oxydent la benzidine avec formation d'un complexe coloré en bleu. Le sulfate de cuivre, dans certaines conditions, a permis à KULBERG [107] d'établir trois tests de différenciation de la benzidine et de l'orthotolidine en solution à 1 %. Le même

auteur, en collaboration avec IVANOVA [92], a préconisé un test basé sur des réactions analogues pour différencier la benzidine de l'orthotolidine.

Parmi les complexes, signalons les combinaisons formées avec divers sels métalliques (chlorure ou sulfate de zinc, chlorure ou sulfate de cadmium) étudiés par HIEBER et RIES [83].

5. ACTIONS DES DÉRIVÉS NITRÉS

Le dichloro-4, 6 dinitro-1, 3 benzène réagit avec la benzidine pour donner une coloration violet sombre d'après JOIS et MANJUNATH [94]. Quant au métadinitrobenzène, il donne naissance à un composé noir ayant un point de fusion compris entre 77,2° et 77,5° selon BUEHLER et HEAP [32].

C) REACTIONS DE DIAZOTATION

La benzidine, comme les autres diamines aromatiques, peut, suivant les cas, fournir un dérivé monodiazoïque ou un dérivé bisdiazoïque. Ces méthodes, nous l'avons vu, sont à la base de la préparation de la plupart des colorants dérivés de la benzidine. De nombreux travaux, ayant pour but de découvrir de nouvelles matières colorantes, ont précisé les modalités de l'action du nitrite de sodium, en faisant intervenir les notions classiques d'acidité et de température du milieu pour obtenir des produits définis. A ce sujet, il faut noter que les deux fonctions ne réagissent pas avec la même facilité ; lorsque l'une d'elles est déjà diazotée, la transformation de la seconde est rendue sensiblement plus difficile. Dès 1925, HODGSON [86], dans un article sur la chimie de la benzidine, donnait les caractères des diazoïques obtenus par diazotation de cette amine. Comme nous l'avons vu, ces diazoïques peuvent être copulés, soit en milieu acide, soit en milieu alcalin (LANGECKER [108]), avec une autre amine, un phénol ou un acide phénol, etc., pour donner cette gamme de colorants qui fait l'intérêt industriel de la benzidine.

De nombreuses autres combinaisons sont possibles faisant intervenir divers agents de copulation. Ainsi des colorants directs pour coton sont obtenus par couplage de la benzidine diazotée avec l'hydroxyquinaldine, l'acide H ou l'acide G (MEYER et SILBERSTEIN [122]).

Inversement, il faut dire que la benzidine bisdiazotée a quelquefois été utilisée comme agent copulant. Il nous semble enfin intéressant de signaler que cette possibilité de diazotation a été mise à profit par WATANABE et ICHINOSE [181] pour doser le groupement NH_2 dans les amines aromatiques primaires par titration avec une solution de nitrite de sodium en présence d'iodure de potassium comme indicateur.

D) REACTIONS D'ACÉTYLATION

Nous avons déjà vu que la benzidine base pouvait réagir avec l'acide acétique pour donner un sel couramment employé, l'acétate de benzidine. Mais l'acide acétique, à chaud, peut se comporter aussi comme agent acétylant, en agissant directement sur le groupement NH_2 qu'il transforme en radical acétyle : $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$. On peut obtenir, en modifiant les conditions, soit le dérivé *monoacétylé*, soit le dérivé *diacétylé* ; ces deux dérivés sont pratiquement peu utilisés dans l'industrie ; en revanche, ils présentent pour notre travail un gros intérêt, car ils constituent, comme nous le verrons dans l'étude du métabolisme, une des formes d'élimination essentielles de la benzidine chez certaines espèces animales.

Leur préparation au laboratoire est assez délicate, surtout pour le dérivé monoacétylé dont le rendement, d'après HOPPER et ALEXANDER [88], est faible. Pourtant, par modification de la méthode préconisée par SCHMIDT et SCHULTZ [150] pour la préparation de la diacétylbenzidine, BERLINGOZZI et TURGO [19] ont obtenu un bon rendement en monoacétylbenzidine ; nous résumons ici la technique que nous avons utilisée : 50 g de benzidine base sont dissous dans 500 ml d'acide acétique glacial ; la solution est mise à bouillir, puis refroidie immédiatement. On la dilue alors avec 500 ml d'eau et on la filtre pour enlever le peu de diacétylbenzidine qui s'est formée et qui est totalement insoluble ; la monoacétylbenzidine contenue dans le filtrat est précipitée par addition d'acide chlorhydrique, recueillie sur filtre, puis lavée à l'eau chaude ; enfin, par trituration avec un excès de soude à 20 %, on obtient la monoacétylbenzidine base qui cristallise dans l'alcool bouillant.

Le dérivé monoacétylé a un point de fusion de 199° .

A côté de l'acide acétique, notons l'action de l'anhydride acétique. L'« I.G. Farben Industrie » rapporte le brevet d'un de ses inventeurs MATZDORF [118] qui fabrique la monoacétylbenzidine en mettant en présence un excès d'anhydride acétique sur une solution aqueuse d'un sel d'acide minéral de la benzidine. DREYFUS [53] utilise, lui aussi, l'anhydride acétique pour obtenir la diacétylbenzidine, mais il provoque la réaction dans un excès de xylol qui ne dissout pas la base aromatique diacétylée. Ce dérivé diacétylé a un point de fusion de $330^\circ/331^\circ$.

Personnellement, nous avons aussi préparé les deux dérivés acétylés en provoquant une réaction équimoléculaire entre la benzidine base et l'anhydride acétique en milieu pyridinique. Nous avons obtenu des produits dont les points de fusion sont identiques à ceux cités plus haut.

Un dernier agent acétylant est le chlorure d'acétyle. ARDASHEV et BYSH [6] ont utilisé ce réactif pour l'acétylation de douze amines aromatiques, parmi lesquelles la benzidine. La conclusion de ces auteurs est que le chlorure d'acétyle donne de meilleurs résultats que les autres réactifs d'acétylation.

Enfin signalons qu'à côté des dérivés mono et diacétylés, existent un dérivé NN.N' tri acétylé (point de fusion 215°/216°) et un dérivé NN, N'N' tétra acétylé (point de fusion 176°).

III. — RÉACTIONS DIVERSES

Parmi ces réactions, nous avons envisagé celles qui nous ont semblé les plus remarquables, soit par l'intérêt qu'elles ont présenté, soit par l'utilisation qu'on peut en faire.

Il s'agit, en général, de réactions souvent colorées qui ont pour terme des produits d'addition ou de condensation obtenus, par action sur la benzidine, de corps de nature chimique différente :

A) ANHYDRIDES D'ACIDES

Nous ne reviendrons pas sur l'action de l'*anhydride acétique* qui a été étudiée plus haut au cours de l'exposé des réactions d'acétylation. Par contre, nous signalerons de nouveau l'action de l'*anhydride phtalique* qui a été particulièrement étudiée par SIRCAR et SEN-GUPTA [157], puis par GUGLIAMELLI, CHANUSSOT et RUIZ [77], qui ont démontré la constitution des composés résultant de l'action de l'anhydride phtalique sur la benzidine en vue de l'étude de la structure de cette amine. SHIMONURA [155] avait déjà mis en évidence la formation de produits d'addition en faisant agir des anhydrides d'acides dicarboxylés, de type $R(CO)_2O$ sur une solution alcoolique ou benzénique de benzidine. C'est ainsi qu'avec l'anhydride phtalique l'auteur obtenait d'abord, sous forme d'un précipité blanc amorphe, un mélange d'acide diphenyl-4,4' diphtalamique et d'acide amino-4 diphenyl monophthalamique-4'. Après dissolution du mélange dans le carbonate de sodium, le dérivé monophthalylé obtenu précipitait sous forme d'un solide blanc de point de fusion compris entre 292° et 295°. Par contre, si on acidifiait la solution carbonatée par l'acide acétique, on obtenait la précipitation du dérivé di-phtalylé.

Enfin, KUHN, JACOB et FURTER [105], par un chauffage de six heures de la benzidine avec l'anhydride phtalique, ont obtenu un mélange de diphtalylbenzidine et de monophthalylbenzidine. D'après

les auteurs, le dérivé diphtalylé, coloré en jaune, aurait un point de fusion de 394° et serait insoluble dans le cyclohexanol ; quant au dérivé monophthalylé coloré en jaune brun, son point de fusion serait de 307° .

B) ALDEHYDES

1) D'après KONDO et ISHIDA [102], l'*aldéhyde formique* se condenserait avec la benzidine pour donner un précipité blanc granuleux dont le point de fusion est de 271° et qui serait une dihydroxyméthylène benzidine.

2) L'*aldéhyde pyromucique* ou furfural, en solution aqueuse saturée et légèrement acidifiée par l'acide acétique, a été utilisé par SANCHEZ [146] pour différencier la benzidine (ou ses sels) d'autres amines ; ainsi la benzidine donnerait une coloration éosine s'intensifiant par addition de quelques gouttes d'acide chlorhydrique et d'alcool, tandis que les naphtylamines donneraient une coloration violette. Les amines cycliques comme l'ortho et le para-aminophénol engendreraient une coloration jaune-rouge. En revanche, les amines aliphatiques et les dérivés acétylés ne provoqueraient aucune coloration.

C) PHENOLS

1) Le *phénol* en solution à 1 % réagirait, selon SCHOORL [151], sur une solution aqueuse de benzidine pour donner un précipité contenant deux molécules de phénol et une molécule de benzidine et dont le point de fusion serait de 137° .

2) Le para et le méta-crésol forment des combinaisons différentes avec la benzidine, ce qui a permis à SAVITT et OTHMER [147] de séparer des mélanges de ces deux corps.

D) QUINONES

1) L'hydroquinone a été utilisée par VLEZENBEEK [175] qui a mis au point un test pouvant servir indifféremment pour la recherche de l'hydroquinone ou de la benzidine en utilisant l'un des deux produits comme réactif. Dans les deux cas, il se forme un fin précipité brun que l'on peut identifier au microscope.

2) La 2-naphtoquinone, sous forme du sel de sodium de son dérivé sulfoné en position 4, a été préconisée par VONESII et VELASCO [176] comme réactif des amines primaires aromatiques.

Avec la benzidine, on obtient un précipité rouge violacé dont le point de fusion est compris entre 208° et 210°. L'aniline donne un précipité pourpre à point de fusion voisin de 234° et l'o.toluidine un précipité rouge qui fond vers 239°.

3) Enfin, BRASS et PAPP [31] ont signalé l'existence d'un produit coloré par action de la *toluquinone* sur la benzidine avec formation de benzidinotoluquinone.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DE LA BENZIDINE

Précisons tout d'abord que nous excluons de ce paragraphe tout ce qui se rapporte aux effets proprement toxiques de la benzidine et à son action cancérigène, que nous étudierons plus loin. Les effets biologiques que nous citons sortent, en effet, du cadre de la toxicologie classique.

KONDO [101], étudiant l'effet de certains composés aromatiques sur les vaisseaux, a constaté que des produits tels que le naphthalène, l'aniline et la benzidine étaient des *vaso-dilatateurs* au point de jouer un rôle préventif contre l'action vaso-constrictrice de l'adrénaline ou du baryum. Il a, de plus, remarqué que l'efficacité de ces composés augmentait par l'union des deux noyaux : ainsi le naphthalène agirait davantage que le benzène, la benzidine davantage que l'aniline.

Sur un autre plan, DANNEBERG et SCHMAHL [43], étudiant les *substances inhibitrices de l'œstrus*, ont trouvé qu'à côté du fluorène, de l'azobenzène et du stilbène, les dérivés aminés en para du diphenyle étaient doués d'un grand pouvoir inhibiteur, lequel ne serait pas aboli par acétylation ou méthylation. Ils relatent, d'autre part, qu'il n'y a pas de relation apparente entre le pouvoir inhibiteur de l'œstrus et l'activité cancérigène.

A côté de ces quelques phénomènes biologiques, on a cherché à attribuer un rôle thérapeutique à la benzidine elle-même.

Les biologistes japonais TAKEO UEDA et collaborateurs [161] ont expérimenté l'action des acides naphthioniques et des composés analogues contre le virus encéphalique japonais ; des souris recevaient quotidiennement par voie intrapéritonéale, pendant 4 à 5 jours, des solutions aqueuses des produits suivants : acide naphthionique, Rouge Congo, Bleu Trypan et benzidine ; après quoi le virus était communiqué aux souris par inoculation intra-cérébrale. Ces auteurs ont constaté que ces quatre produits jouaient un rôle préventif, alors que l'acide sulfanilique et le Rouge Trypan n'agissaient pas. En revan-

che, LEVADITI et coll. [110] ont recherché sans succès une action curative et antitoxique du sulfate de benzidine dans les infections expérimentales à gonocoques ou méningocoques. De même, des dérivés de la benzidine tels que le Rouge Congo, le Bleu Trypan et la Naganine ne peuvent être utilisés dans la chimiothérapie des brucelloses parce que *trop toxiques* (DROBOT'KO et coll. [54]).

Enfin, on a signalé une action antituberculeuse de la benzidine (FURST et coll. [70]).

CHAPITRE QUATRIÈME

LES EFFETS TOXIQUES DE LA BENZIDINE

L'examen des quelques propriétés biologiques de la benzidine qui a terminé notre troisième chapitre nous amène à envisager, dans un chapitre séparé, les propriétés *toxiques* de cette base. Nous insistons sur son effet nocif essentiel, à savoir son action cancérigène chez différentes espèces, mais auparavant, nous passerons en revue quelques effets toxiques secondaires importants.

I. — EFFETS TOXIQUES DE LA BENZIDINE AUTRES QUE SON POUVOIR CANCÉRIGÈNE

Divers effets toxiques ont été signalés concernant certains organes ou tissus :

1. SUR LE SANG

YANKOVSKII et KRECHTOVA [189] ont remarqué un pouvoir agglutinant assez prononcé de la benzidine sur le sang de divers animaux (Lapin, Chien, Bœuf, Porc, Cheval) et sur celui de l'Homme, ce pouvoir se manifestant quel que soit le groupe sanguin. Sur 40 composés expérimentés par les auteurs, la plupart de ceux du groupe des colorants (vert de méthyle, violet de méthyle, bleu de méthylène, chrysoïdine, etc.) possèdent cette action agglutinante ; en revanche, les α et β -naphtylamines sont inactives.

Par ailleurs, on peut s'attendre à ce que la benzidine possède, en tant que représentant du groupe des amines primaires aromatiques, une nette *action méthémoglobinisante*. Nous discuterons ce point à l'occasion de l'étude des formes cliniques de l'intoxication et de l'exposé de nos résultats personnels concernant la mise en évidence de la méthémoglobine chez l'animal intoxiqué.

2. SUR LE FOIE

ZYLBERSZAC [191] a constaté que l'implantation sous-cutanée d'au moins 25 mg de benzidine base, à intervalles de 5 à 15 jours, provoquait une *cirrhose du foie* sans prolifération nodulaire en un temps variant de 2 à 5 mois ; ce fait a été également mis en évidence par SPITZ, MAGUIGAN et DOBRINER [159] : des composés voisins de la benzidine, comme le p.p' diaminodiphénylméthane et la N.N, N'N' tétraméthylbenzidine, provoqueraient une cirrhose analogue, mais avec prolifération nodulaire. Quelques années plus tard, PLETCHER, THOELLEN et RICHTERICH [133], étudiant les variations des amino-acides et de la phosphatase alcaline dans le foie de rats intoxiqués chroniquement par trois amines industrielles : aniline, β -naphtylamine et benzidine, ont constaté que les amino-acides ne variaient pas chez les rats traités à la β -naphtylamine ; chez les rats soumis à la benzidine, seules la cystine et la sérine augmentèrent. Par contre, le taux de phosphatase alcaline subit une chute dans les trois cas et, pour la benzidine, cette baisse s'accompagna d'un développement excessif des capillaires biliaires.

3. SUR LA PEAU

Enfin, la *peau* qui peut être, comme nous le verrons, une voie de pénétration du toxique, subit elle-même les effets nocifs du contact avec la benzidine. Dès 1924, HENKEL [81] signalait une irritation chronique de la peau par différents produits tels que l'aniline ou l'huile de croton, mais aussi par la benzidine.

Plus récemment, BAER [9] a signalé un cas de *dermatose* causée chez un *chimiste* manipulant de la benzidine pour la recherche du sang dans les selles. Dans le domaine industriel, BLUM et SMAGGHE [24], à la suite de VON OETTINGEN [177], MAYER [179], MEIGS et SCIARINI [121], ont rapporté des cas de *dermites* observés chez des ouvriers au cours de la fabrication des matières colorantes. Parmi les cas rapportés par BLUM et SMAGGHE [24], il faut signaler une dermatose due à la benzidine et se traduisant par des phénomènes inflammatoires au niveau du derme. La guérison est survenue à la suite d'un simple arrêt de travail de 20 jours. Il faut noter, sur un plan plus général, que BLUM et SMAGGHE insistent dans leur article sur le rôle favorisant de l'*allergie*, de la photosensibilisation et des agents chimiques de nettoyage (eau de Javel en particulier). Ils soulignent enfin que l'imprégnation chronique par l'alcool constitue également un facteur favorable ; on retrouve, ici, la notion bien connue de l'action favorable de l'alcool sur les effets toxiques des amines aromatiques, en particulier au niveau de la peau.

II. — EFFETS CANCÉRIGÈNES DE LA BENZIDINE

Quelle que soit leur importance, les quelques phénomènes toxiques que nous venons de passer en revue n'auraient pas contribué à classer la benzidine parmi les poisons industriels générateurs de maladies professionnelles. Il en va tout autrement lorsque l'on considère son action cancérogène que nous allons étudier.

Si l'action cancérogène de la benzidine se manifeste essentiellement au niveau de la vessie, elle n'est pourtant pas strictement limitée à cet organe, du moins chez l'animal. Nous exposerons donc brièvement les effets cancérogènes de la benzidine sur d'autres organes que la vessie avant d'étudier en détail son effet cancérogène vésical.

a) EFFETS CANCÉRIGÈNES SUR D'AUTRES ORGANES QUE LA VESSIE

A ce sujet, il faut tout particulièrement noter les travaux de SPITZ, MAGUIGAN et DOBRINER [159], suivant lesquels la benzidine aurait provoqué chez le Rat trois types de tumeurs localisées, soit au niveau du foie, soit des glandes sébacées adjacentes au conduit auditif, soit du colon.

Pour préciser, nous indiquons dans le *tableau I* les résultats obtenus par les auteurs en injectant à l'animal de la benzidine technique, de la benzidine pure et du sulfate de benzidine en solution ou en suspension dans l'huile d'olive. Ce dernier composé était, de plus, administré par voie buccale.

Les auteurs signalent que les mâles sont plus sensibles à l'action de la benzidine que les femelles : 11 % d'hépatomes chez les rats mâles contre 0,9 % chez les rats femelles ayant reçu de la benzidine pure. BAKER [10], au cours d'une expérimentation que nous étudierons en détail dans notre cinquième partie, a constaté l'apparition d'hépatomes, dont un malin, chez 5 souris faisant partie d'un lot de 12 animaux ayant reçu de la benzidine par injection.

b) EFFET CANCÉRIGÈNE VÉSICAL

Comme nous l'avons signalé au début de notre travail, il a fallu un certain temps, en raison du nombre important de matières premières, pour mettre en évidence l'action cancérogène vésicale de la benzidine. Cette action a d'ailleurs été longtemps très discutée ; il faut reconnaître que, si les observations faites en hygiène industrielle apportent une haute présomption en faveur du rôle de la benzidine dans l'étiologie des tumeurs vésicales, en revanche, les constatations

TABLEAU I

COMPOSÉ	QUANTITÉ MOYENNE ADMINISTRÉE (en mg/semaine)	NOMBRE TOTAL DE RATS	HÉPATOMES		TUMEURS DES GLANDES SÉBACÉES	
			Nombre	Temps minimum d'apparition (en jours)	Nombre	Temps minimum d'apparition (en jours)
Benzidine technique	15	233	8 (3,4 %)	264	54 (23 %)	190
Benzidine pure	15	152	6 (3,9 %)	245	32 (21 %)	188
Sulfate de benzidine :						
— Injecté	15	153	1 (0,65 %)	261	16 (10,5 %)	229
— Absorbé	15	37	1 (2,7 %)	536	2 (5,4 %)	239

expérimentales chez l'animal sont loin d'être concluantes. Il est vrai, et nous insistons sur ce point, que nous développerons d'ailleurs plus longuement par la suite, que l'action cancérigène de la benzidine n'apparaît qu'à très *longue échéance*. Nous avons avec cette base un exemple typique de toxique dont les effets ne se manifestent qu'à très long terme et lui fait ainsi occuper une place tout à fait spéciale parmi les agents de toxicité chronique. Cette notion est essentielle à souligner, car elle explique les difficultés rencontrées par les biologistes pour reproduire expérimentalement le cancer de la vessie.

Nous examinerons successivement l'action cancérigène de la benzidine chez l'Homme et chez l'Animal.

A) OBSERVATIONS CLINIQUES CHEZ L'HOMME

TRUHAUT [164 - 167] a rappelé dans différents articles combien il était légitime de suspecter la benzidine dans l'origine des cancers vésicaux professionnels. C'est qu'en effet les cas reconnus et cités par la plupart des auteurs, médecins du travail et hygiénistes, sont à la fois nombreux et précis, en dépit des difficultés de l'interprétation clinique dues à la présence d'autres amines.

Tout en respectant l'ordre chronologique, nous rapporterons les faits et les opinions, parfois opposées, des principaux spécialistes de l'étude des cancers vésicaux professionnels.

Bien que la benzidine soit déjà suspectée comme agent cancérigène, NASSAUER [126], en 1919, nie son action et prétend que les tumeurs de la vessie chez les ouvriers qui la manipulent sont dues à l'aniline.

D'après l'auteur, la benzidine, introduite dans l'organisme sous forme de poudre sèche, par voie digestive ou respiratoire, ne produit pas de tumeurs. En revanche, NASSAUER pose déjà le problème de « produits d'élimination inconnus, qui stimuleraient la croissance des cellules de l'épithélium vésical ».

Une année plus tard, OPPENHEIMER [129], que nous avons déjà cité, suspecte, comme agents responsables, à la suite de 20 cas de tumeurs de la vessie, la *benzidine*, à côté de l'aniline et de la β -naphthylamine.

En 1937, EVANS [61] incrimine, dans 83 cas de tumeurs vésicales, les α et β -naphthylamines et la benzidine. Mais, contrairement à NASSAUER, il n'admet pas l'action cancérigène de l'aniline.

MULLER [124], en 1939, rapporte un cas assez curieux de cancer, non de la vessie mais de l'uretère, chez un ouvrier préposé à la mani-

pulation de la benzidine. L'auteur aborde la discussion du mécanisme de l'action cancérigène et se demande si le sang n'est pas le transporteur des agents actifs.

L'année 1948, à l'occasion du IX^e Congrès de Médecine Industrielle à Londres, et l'année 1949 voient une abondance de rapports, comptes rendus et publications émanant de divers pays du monde :

En Angleterre, GOLDBLATT [76] signale 99 cas de tumeurs vésicales, dont 59 avec issue fatale, de 1934 à 1947, dans deux usines traitant une large gamme de produits, parmi lesquels l'aniline, les α et β -naphtylamines et la benzidine, cette dernière étant considérée par l'auteur comme responsable au même titre que la β -naphtylamine.

En Italie, DI MAIO [49] cite des chiffres inquiétants, puisqu'à la suite d'exams urologiques effectués chez 213 ouvriers manipulant de la benzidine, on a découvert 22 tumeurs de la vessie et 36 lésions congestives (les lésions congestives étant considérées par l'auteur comme pré-cancéreuses).

A la même époque, BARSOTTI et VIGLIANI [15] rapportent que, sur 142 ouvriers examinés parmi 203 exposés pendant plus d'un an, de 1931 à 1948, à la β -naphtylamine et à la benzidine, ils ont découvert 33 tumeurs et 58 congestions de la vessie.

Ils ajoutent même que, de toutes les amines aromatiques considérées, la benzidine possède le plus fort pouvoir cancérigène (parmi les ouvriers examinés, 92 étaient à la section benzidine).

En Suisse, MULLER [125], dont nous avons déjà parlé plus haut, a établi une statistique des maladies vésicales d'origine professionnelle observées à Bâle de 1911 à 1948 : 132 cas de tumeurs ont été observés, dus, surtout, au contact avec la β -naphtylamine et la benzidine.

Aux Etats-Unis, HUEPER [89] cite la β -naphtylamine et la benzidine comme agents responsables des tumeurs de la vessie.

Enfin, en France, ABOULKER, GAULTIER, BENGUIGUI et SMAGGHE [2] signalent, chez un ouvrier ayant été pendant 6 ans en contact avec la benzidine, une nette vascularisation du trigone, mais sans papillome. Quant à DOUILLET [51] et à BILLIARD-DUCHESNE [21], ils rapportent respectivement 5 et 15 cas de tumeurs de la vessie et considèrent qu'elles sont en relation avec un contact prolongé avec la benzidine.

En 1952, parmi des chiffres éloquentes cités par SCOTT de la CLAYTON ANILINE CO [153], nous remarquons que, sur 66 cas de cancers vésicaux détectés chez des ouvriers d'une manufacture de colorants, 30 sont dus à la benzidine seule qui vient largement en tête

devant la β -naphtylamine, cette dernière n'étant responsable que de 15 cas.

Nous retrouvons en 1953 les auteurs français cités plus haut, et en particulier ABOULKER et SMAGGHE [1], qui font état de 21 cas de tumeurs de la vessie observées de 1941 à 1952 chez des ouvriers manipulant, soit les naphtylamines, soit la benzidine, soit un mélange de ces amines. La benzidine serait à incriminer dans 2 cas de tumeurs dont l'une maligne. Il est à noter, toujours d'après ces auteurs, que le mélange d' α -naphtylamine et de benzidine serait responsable de l'apparition de 6 tumeurs dont 2 malignes.

Une publication d'UEBELIN et PLETSCHER [172] datant de 1954, signale que, dans une usine de Bâle, pendant une période de 29 ans (de 1924 à 1953), 100 ouvriers ont été atteints de tumeurs vésicales provoquées par la β -naphtylamine et la benzidine.

Enfin, en 1957 est paru un rapport de CHWAT [39], dans lequel l'auteur cite les résultats qu'il a obtenus à la suite de 250 cystoscopies effectuées chez 162 ouvriers employés à la fabrication de toute une série de matières colorantes. Il y est noté que, sur 30 ouvriers occupés exclusivement à la « section benzidine », 2 étaient porteurs de papillomes et 5 de tumeurs malignes de la vessie.

Les faits cliniques que nous venons de rapporter conduisent à considérer la benzidine comme jouant un rôle très important dans l'étiologie des cancers vésicaux professionnels. Il faut, d'autre part, bien souligner que si les hygiénistes des différents pays n'admettent pas sans discussion que cette amine aromatique soit le facteur causal des tumeurs vésicales, c'est que l'interprétation des faits cliniques se heurte à toute une série d'obstacles parmi lesquels il faut citer :

— l'impossibilité fréquente de dissocier les effets de la benzidine de ceux dus aux impuretés qui la souillent ou des autres amines manipulées dans les mêmes locaux ;

— les difficultés rencontrées par les médecins du travail pour suivre, autant qu'il le faudrait, les sujets exposés, soit que ces derniers aient changé d'emploi, soit qu'ils se prêtent de mauvaise grâce à une enquête suffisamment poussée pour être rigoureuse ; il faut ici compter avec le caractère désagréable de certains examens, tout particulièrement de la cystoscopie.

* * *

Comme dans le cas des autres agents chimiques dont les observations cliniques avaient conduit à suspecter le caractère cancérogène, les spécialistes de ces questions ont essayé de confirmer cette action par l'expérimentation animale.

B) CONSTATATIONS EXPERIMENTALES CHEZ L'ANIMAL

Les premières expériences sont dues à GEHRMANN, FOULGER et FLEMING [74]. Ces auteurs ont expérimenté chez le *Chien*, l'aniline, la dianisidine, la β -naphtylamine et la benzidine. Quatre animaux ont reçu une dose journalière de 117 mg de benzidine par voie buccale pendant 5 ans. A la fin de cette période, aucune tumeur vésicale n'a pu être décelée chez ces animaux ; de tous les composés essayés, seule la β -naphtylamine a provoqué des tumeurs après une intoxication d'une durée minimum de 50 jours.

Il en a été de même pour TRUHAUT [167], qui, après avoir suivi pendant 52 mois, 6 chiens auxquels étaient administrés journallement « per os » environ 25 mg/kg de benzidine pure, n'a pu mettre en évidence aucune tumeur.

BONSER [26] n'a obtenu également que des résultats négatifs chez des chiens, ayant reçu pendant 5 ans des doses énormes de toxique, puisque atteignant par animal le chiffre total d'environ 700 g.

SPITZ, MAGUIGAN et DOBRINER [159] ont été plus heureux : 7 chiens (1 mâle et 6 femelles) ont reçu, six jours par semaine, pendant une période de 5 ans dans leur nourriture, des capsules contenant 200 mg de benzidine, pendant les 15 premiers mois, et ensuite 300 mg jusqu'à la fin de l'intoxication, soit au total environ 325 g d'amine par animal pour une période d'expérimentation de 60 mois. Les auteurs ont remarqué que la benzidine était bien tolérée par l'animal et ne donnait lieu à la production d'aucun signe toxique apparent. Les chiens ont subi des cystoscopies régulières qui se sont révélées sans résultat. Ces auteurs eurent alors l'idée de *prolonger l'observation* des animaux et ils virent se développer, au bout de 84, 96 et 120 mois, chez 3 chiens *ayant vécu assez longtemps*, des papillomes ou des cancers de la vessie. Nous saisissons ici toute l'importance du facteur « temps » qu'il est essentiel de toujours considérer dans ce genre d'expérimentation.

D'autres espèces animales ont été également soumises à l'expérimentation. En dehors des cas de tumeurs du conduit auditif et des hépatomes décelés chez le Rat dont nous avons déjà parlé, nous signalerons un épithélioma obtenu par TRUHAUT et LOISILLIER [169] chez le Cobaye à la suite d'implantation intra-vésicale directe de benzidine pure ; cette dernière méthode présente un gros intérêt car elle permet d'apprécier, « in situ », le rôle exact joué par la benzidine elle-même, à l'exclusion de ses produits de transformation éliminés par le rein. Malheureusement, la survie insuffisante des animaux traités a beaucoup gêné les auteurs et ne leur a pas permis d'observer les effets du toxique à très longue échéance.

Pour ce qui est des autres espèces animales, aucun cancer de la vessie n'a pu être découvert à la suite de traitements prolongés ni chez le Singe, ni chez le Lapin. Pour ce dernier animal, l'expérience entreprise par SPITZ, MAGUIGAN et DOBRINER [159] sur 22 lapins femelles recevant chaque semaine, par voie sous-cutanée, 75 à 150 mg de benzidine dans l'huile d'olive, s'est soldée par la mort de la moitié des animaux dans les 100 premiers jours de l'expérimentation, mais sans apparition d'aucune lésion cancéreuse de la vessie.

En conclusion de ce chapitre, il faut reconnaître que si les faits cliniques sont assez éloquents pour permettre une suspicion légitime de la benzidine comme agent cancérigène actif, les faits expérimentaux sont rares et limités à deux espèces animales, le Chien et le Cobaye.

Néanmoins et compte tenu des difficultés rencontrées par les expérimentateurs, les constatations cliniques sont suffisamment démonstratives pour inscrire la benzidine sur la liste des agents chimiques reconnus cancérigènes.

CHAPITRE CINQUIEME

ÉTUDE DES INTOXICATIONS PAR LA BENZIDINE

Après avoir mis en évidence l'action toxique de la benzidine chez l'Homme et chez l'Animal, nous étudierons successivement l'étiologie des intoxications, les voies de pénétration du toxique, les doses toxiques et, enfin, les formes cliniques des intoxications ainsi que les modifications histologiques intervenant au niveau de l'épithélium vésical.

I. — ÉTIOLOGIE DES INTOXICATIONS

Théoriquement, les contacts avec la benzidine ne concernent qu'un petit nombre d'individus, ceux qui fabriquent la base et ceux qui la transforment en matière colorante. Il s'agit donc surtout d'un *poison industriel*. En revanche, la benzidine n'est pratiquement jamais à l'origine d'intoxications domestiques, car, contrairement à beaucoup d'autres produits (solvants, acides, etc.), elle n'a heureusement pas d'emploi sur le plan ménager.

Pourtant, il ne faut pas oublier, et ceci nous semble d'une extrême importance, que certains colorants dérivés de la benzidine pourraient éventuellement être utilisés pour colorer des denrées alimentaires et des formes pharmaceutiques telles que des comprimés ou des dragées. Or, outre que ces colorants peuvent contenir sous forme d'impuretés des traces de benzidine, ils sont susceptibles de subir dans l'organisme des transformations métaboliques consistant, en particulier, en réduction des liaisons $\text{— N} = \text{N} \text{—}$ avec libération de benzidine. On s'explique ainsi qu'un colorant comme le Rouge Trypan ait pu manifester des propriétés cancérogènes et ait été pour cette raison classé par les experts du Symposium, tenu à Rome en août 1956 sous l'égide de l'« Union Internationale contre le Cancer », parmi les colorants dangereux ne devant pas être ajoutés aux aliments et aux boissons

de l'Homme et des animaux. Le problème est d'autant plus important que, comme l'a souligné TRUHAUT [168], l'alimentation est un facteur auquel l'homme est fatalement soumis pendant toute sa vie, et qu'ainsi se trouvent réalisées les conditions optimales à la manifestation des effets de toxicité à long terme et particulièrement des effets de somation mis en évidence par DRUCKREY et KUPFMÜLLER [55].

Il faut également penser, comme nous l'avons déjà signalé, à l'utilisation en thérapeutique des produits comme le Rouge Trypan et le Rouge Congo ; soulignons toutefois que le danger est ici beaucoup moins grand en raison du caractère en général peu prolongé des traitements.

Mais, comme nous l'avons dit, c'est évidemment dans le domaine de l'hygiène industrielle que les risques de nocivité de la benzidine ont le plus de chance de se manifester, soit, lors de la fabrication de la base, soit à l'occasion de ses emplois comme matière première dans la synthèse des colorants.

A) FABRICATION

Nous avons déjà exposé dans la partie chimique de notre travail, les différents modes de fabrication de la benzidine. Si des précautions rigoureuses ne sont pas prises, les ouvriers chargés des manipulations risquent, à chaque instant, d'absorber de faibles quantités de benzidine, soit par voie digestive, soit par voie cutanée, soit même par voie respiratoire. GOLDBLATT [76] rapporte que 99 cas de tumeurs vésicales (dont 59 furent fatales) ont été découverts de 1934 à 1937 dans deux usines *fabriquant* toute une gamme de produits, en particulier la benzidine par réduction électrolytique du nitrobenzène en hydrazobenzène en milieu alcalin et transposition en milieu acide. L'auteur signale que les tumeurs ont été décelées chez des ouvriers *préparant* la benzidine. BARSOTTI et VIGLIANI [15], dans une étude statistique des lésions de la vessie causées par les amines, ont constaté que, dans le cas de la benzidine, le stade de la *fabrication* de la base était le plus dangereux pour l'ouvrier et, en particulier, les phases suivantes : *filtration, agglomération, dessiccation et moulinage*. Enfin, SCOTT et WILLIAMS [154], dans une publication récente, prétendent que le danger existe dès la transformation de l'hydrazobenzène en benzidine.

B) EMPLOIS

En général, la benzidine est traitée sur le lieu même de sa fabrication. Les risques de pollution restent donc les mêmes, avec cette

différence pourtant que le temps de contact entre l'ouvrier et la base elle-même est moins long, puisque cette dernière est salifiée avant d'être le plus souvent diazotée ; ce point peut présenter de l'importance : certains, MULLER [125] entre autres, prétendent que les bases cancérigènes perdent leur nocivité lorsqu'elles sont salifiées.

A propos des risques de nocivité dus aux emplois de la benzidine, il faut souligner que ces risques ne se limitent pas aux ouvriers manipulant la base, mais peuvent aussi, dans certains cas, se manifester chez des sujets vivant dans le voisinage des usines par suite des pollutions de l'atmosphère autour de ces dernières. De tels cas ont été signalés par OPPENHEIMER [129] dès 1920.

II. — VOIES DE PÉNÉTRATION DU TOXIQUE

La benzidine peut, ainsi que nous l'avons déjà mentionné plus haut, pénétrer dans l'organisme par les voies orale, pulmonaire ou cutanée.

A) VOIE ORALE

Bien qu'accidentelle, elle peut être fréquente, l'apport du produit à la bouche étant, comme dans le cas de beaucoup d'autres toxiques, réalisé soit par des mains ou des instruments souillés, soit par des aliments ou boissons pollués.

B) VOIE PULMONAIRE

Elle peut être continue, l'ouvrier inhalant, pendant son travail, la benzidine, soit sous forme de fines poussières, soit même, en raison du caractère *sublimable* de cette base, sous forme de vapeurs lorsque la température est suffisamment élevée.

C) VOIE CUTANÉE

Pour la plupart des hygiénistes, elle serait la plus fréquente et, en même temps, la plus nocive. Elle peut se faire, soit par contact direct entre la peau et l'amine, soit par l'intermédiaire des vêtements imprégnés. A ce sujet, il semble utile de signaler que les méthodes de caractérisation ou de dosage de la benzidine dans les atmosphères des locaux de travail ne considéreraient pas, du moins au début, le toxique adhérent au vêtement de travail ou en contact permanent avec

la peau. Quoi qu'il en soit, parmi les auteurs ayant attiré l'attention sur le passage de la benzidine à travers la peau, il faut citer, entre autres : aux Etats-Unis, MEIGS, SCIARINI et VAN SANDT [121] ; en France, BILLIARD-DUCHESNE et DOUILLET [21, 51]. Ces derniers ont particulièrement insisté sur le rôle essentiel joué par la voie cutanée dans l'étiologie des cancers vésicaux industriels.

III. — DOSES TOXIQUES

Nous distinguerons les formes d'intoxication aiguë, subaiguë et chronique.

A) INTOXICATION AIGUE

Nous n'avons relevé dans la bibliographie toxicologique, aucun cas d'intoxication aiguë par la benzidine chez l'Homme. D'après les résultats de notre expérimentation animale, il faudrait sans doute des doses relativement importantes de produit (de l'ordre de plusieurs grammes) pour provoquer des effets nocifs graves et la mort.

Sur le plan expérimental, en revanche, de nombreuses intoxications aiguës ont été provoquées chez l'Animal : DIEKE, ALLEN et RICHTER [47], soumettant à l'expérimentation près de 200 substances, en vue de rechercher leur pouvoir rodenticide éventuel, ont montré que, chez le Rat de race « Norway », la DL 50 *per os* de la benzidine était d'au moins 500 mg/kg, d'ailleurs identique à celle trouvée pour l'ortho-toluidine. Personnellement, au cours de notre expérimentation, nous avons trouvé que, chez le Rat de race « Wistar », la dose mortelle se situait entre 150 et 200 mg/kg, par voie intrapéritonéale. Le Lapin semble plus sensible, puisque, par une simple injection à 100 mg/kg de benzidine dans le propylène glycol, nous avons provoqué la mort de cet animal. Quant au Cobaye, il ne résiste guère à des doses supérieures à 50 mg/kg. Ces chiffres soulignent la différence de sensibilité des diverses espèces animales à la benzidine, ce qui est d'ailleurs une constatation générale pour la plupart des toxiques.

B) INTOXICATION SUBAIGUE

De même que pour l'intoxication aiguë, nous n'avons pu relever, dans la bibliographie, aucun cas d'intoxication subaiguë. Nous présenterons les résultats que nous avons obtenus chez l'Animal au premier chapitre de la troisième partie de ce travail.

C) INTOXICATION A LONG TERME DITE CHRONIQUE

Ce mode d'intoxication est de très loin le plus important. En effet, si chez l'Homme, la benzidine n'a pratiquement jamais été à l'origine d'intoxications aiguës ou subaiguës, en revanche, elle peut être considérée comme le type même du poison industriel manifestant ses effets nocifs à longue échéance à la suite de l'absorption, prolongée pendant une longue période, de doses même très minimes. Il faut bien souligner que, étant donnée la nature de ces effets nocifs, en l'espèce une action cancérigène, on peut penser, ainsi que cela a été démontré pour d'autres agents cancérigènes comme le p. diméthylaminoazobenzène ou « jaune de beurre » [55], que la benzidine présente le phénomène de la « *sommation des effets* » et l'action à *retardement*.

1. LA NOTION DE « SOMMATION DES EFFETS »

Cette notion semble s'opposer à la conception classique du mode d'action des agents responsables des phénomènes de toxicité chronique. Dans le cas général des poisons dits « cumulatifs » c'est-à-dire retenus dans l'organisme à la faveur d'affinités physiques ou chimiques, tels que les toxiques liposolubles, le fluor ou les métaux lourds, les faits connus jusqu'ici autorisent à considérer leur action toxique comme réversible et diminuant au fur et à mesure de l'élimination, ce qui permet, en tenant compte des vitesses plus ou moins grandes de cette dernière, de fixer des « doses seuil » en deça desquelles il n'y a plus de danger. Il ne semble pas en être de même dans le cas des composés cancérigènes. Les expériences effectuées avec certains d'entre eux tels que le jaune de beurre, le paradiméthylaminostilbène ou les hydrocarbures polycycliques, font penser que les effets de chaque dose isolée s'ajoutent, sans aucune perte, pendant toute la vie, quel que soit le jeu des éliminations. Il y aurait « *sommation totale d'effets absolument irréversibles* ». Pour illustrer cette notion, il nous paraît indispensable de présenter en détail, dans le *tableau II*, les résultats obtenus par DRUCKREY et KUPFFMÜLLER dans le cas du para-diméthylazobenzène qui est un agent cancérigène hépatique. Ces auteurs ont administré l'azoïque « per os » à des doses journalières maintenues constantes pendant toute la durée de l'expérimentation, mais variables pour chaque lot d'animaux. Ils ont vu que, comme on pouvait s'y attendre, le délai d'apparition en jours (t) des hépatomes dans chaque lot, était d'autant plus court que la dose journalière (d) était plus forte, mais aussi que la dose totale (dt), pour faire apparaître les tumeurs hépatiques, *était pratiquement constante* (1.000 mg par rat avec la souche utilisée) pour des durées d'expérience allant de 32 à 700 jours.

Si la benzidine agit de la même façon, comme on peut le présumer, on conçoit aisément le danger que présente, dans ces conditions, l'exposition prolongée, pendant plusieurs années à des doses si minimes soient-elles de cette amine aromatique. Ceci entraîne comme conséquence, la nécessité de ne tolérer dans l'atmosphère des locaux de travail que des concentrations très minimes : c'est pourquoi la Commission de Toxicologie et d'Hygiène Industrielle de l'I.U.P.A.C. a été amenée à fixer la *concentration maximum tolérable* à un *chiffre aussi bas que 0,01 mg par m³ d'air*.

TABLEAU II
ACTIVITÉ CANCÉRIGÈNE DU P.-DIMÉTHYLAMINOAZOBENZÈNE
EN FONCTION DE LA DOSE CHEZ LE RAT

DOSE JOURNALIÈRE DU P.D.A.B. (d) (en mg)	DÉLAI D'APPARITION DES HÉPATOMES (t) (en jours)	DOSE TOTALE D = dt (*) (en mg)	NOMBRE DE RATS
0,1	Pas de tumeurs		155
0,3	Pas de tumeurs		148
1	700	700	169
3	350	1.050	70
5	190	950	70
6	167	1.000	145
10	95	950	30
20	52	1.040	15
30	34	1.020	30

(*) Evidemment, la valeur du produit *dt* dépend de la souche du Rat expérimentée ; elle est, d'après DRUCKREY, comprise entre 350 et 1.200 mg.

2. L'ACTION A RETARDEMENT

Au cours de notre exposé général sur les effets toxiques de la benzidine au chapitre quatrième, nous avons insisté sur les difficultés rencontrées par le médecin du travail et le biologiste pour prouver l'action cancérigène de la benzidine, et en particulier sur l'impossibilité de dissocier les effets de la benzidine de ceux dus aux impuretés qui la souillent ou des autres amines manipulées dans les mêmes locaux. A ces difficultés s'ajoute un obstacle supplémentaire de première

importance : celui du temps qui s'écoule entre le début de l'exposition à l'amine et l'apparition de la tumeur. *Ce temps de latence est toujours très prolongé* et c'est là une notion qui est prépondérante dans l'étude des faits cliniques chez l'Homme et l'expérimentation chez l'Animal.

a) *Observations cliniques chez l'Homme :*

L'exposé bibliographique des faits cliniques, que nous avons présenté dans le chapitre précédent, nous a déjà montré que les cas de tumeurs vésicales ne se révélaient qu'au bout d'un grand nombre d'années ; il faut souligner que, dans la plupart des cas reconnus chez l'Homme, la période moyenne s'écoulant avant la découverte de la tumeur est d'au moins 10 ans. DI MAIO [49] a constaté 2 cas de tumeurs malignes dues à la benzidine au bout de 5 et 10 ans. OPPENHEIMER [129] prétend même qu'il faut 10 à 20 ans pour qu'apparaissent les tumeurs. D'après BARSOTTI et VIGLIANI [15], le délai minimum est de 3 ans et le délai maximum de 18 ans. Enfin, pour UEBELIN et PLETSCHER [172], le temps de latence varie de 1 à 44 ans pour un total de 100 ouvriers atteints de tumeur de la vesie.

b) *Expérimentation chez l'Animal :*

Nous avons vu que, chez l'animal, les résultats ont été le plus souvent négatifs bien que des doses énormes aient été administrées. C'est, qu'en effet, intervenait dans l'expérimentation le facteur du temps de latence dont nous venons de souligner l'importance. Chez le Lapin, nous avons rappelé que SPITZ, MAGUIGAN et DOBRINER [159] n'avaient pu mettre en évidence de lésions cancéreuses chez 22 animaux « femelles » recevant chaque semaine, par voie sous-cutanée, 75 à 150 mg de benzidine dans l'huile d'olive, mais la moitié des animaux avaient succombé dans les 100 premiers jours de l'expérimentation. Les auteurs reconnurent alors la difficulté de prolonger suffisamment longtemps l'expérience pour provoquer l'apparition de tumeurs. Ils rappelèrent que, dans des expérimentations analogues de BEREMBLUM et BONSER [17], les animaux avaient reçu plus de deux fois la quantité de benzidine sans résultat positif, bien qu'ils aient survécu plus longtemps. Quant à l'administration de la benzidine par voie buccale, elle peut, étant la moins toxique, permettre une survie plus longue des animaux ; à ce sujet, nous rappellerons simplement que seuls SPITZ, MAGUIGAN et DOBRINER [159] ont vu apparaître des tumeurs vésicales chez trois chiens, après avoir eu l'idée de prolonger une expérimentation qui durait déjà depuis 5 ans, alors que TRUHAUT [167] n'avait obtenu aucun résultat positif chez 6 chiens ayant reçu de la benzidine pendant 52 mois.

Nous devons ajouter qu'il n'existe pas de relation rigoureuse entre le temps de latence et la *période d'exposition au toxique*, sauf, comme le fait remarquer GOLDBLATT [76], lorsque le travail a été poursuivi jusqu'à la découverte de la tumeur. Le plus souvent, les signes cliniques n'apparaissent que plusieurs années après la cessation du travail dangereux.

IV. — FORMES CLINIQUES DES INTOXICATIONS

Nous étudierons successivement les symptômes des intoxications chez l'Homme et chez l'Animal.

A) INTOXICATIONS CHEZ L'HOMME

Il ne saurait être question d'envisager, comme il est habituel, les *intoxications aiguë ou subaiguë*, puisque nous n'avons pu découvrir aucune observation de ce genre dans la bibliographie toxicologique. Pourtant, nous avons déjà souligné que, vu l'étroite parenté chimique entre la benzidine et les autres amines aromatiques telles que l'aniline, on pouvait prévoir pour la benzidine une action méthémoglobinisante entraînant l'apparition de phénomènes d'asphyxie accompagnés de cyanose. Mais là encore, aucune observation humaine ne vient à l'appui de cette hypothèse ; bien plus, la plupart des traités classiques d'hygiène industrielle s'accordent pour ne reconnaître à la benzidine qu'une très faible action méthémoglobinisante comparative-ment à celle de l'aniline [63].

Nous rappellerons à ce sujet, que cette dernière, dont le pouvoir cyanosant est bien connu, n'est pas méthémoglobinisante « in vitro » et que, comme l'a fait remarquer TRUHAUT [166], on peut suspecter, dans l'organisme, l'action méthémoglobinisante des « métabolites » (o. ou p. amino-phénol, phénylhydroxylamine, etc.).

GAULTIER, BENGUIGUI et SMAGGHE [73], rapportant 33 cas d'intoxications aiguës méthémoglobinisantes légères, citent comme produits responsables l'aniline, la p. nitraniline, l'o. toluidine, le nitrobenzène, le chloronitrobenzène, mais spécifient qu'aucun cas ne semble pouvoir être rapporté à la benzidine. Nous reviendrons sur cette question du pouvoir méthémoglobinisant de la benzidine en exposant les résultats que nous avons personnellement obtenus chez l'Animal.

L'intoxication à long terme, dite chronique, nous retiendra plus longtemps. Nous avons vu qu'elle se traduisait essentiellement par l'apparition de tumeurs vésicales après un long temps de latence. Mais

il ne faut toutefois pas oublier qu'un autre organe que la vessie peut être touché, d'ailleurs beaucoup plus précocement. Il s'agit de la *peau* qui, sous l'action de la benzidine, présente des irritations du type *dermite* sur lesquelles ont insisté en particulier HENKEL, BAER, MEIGS et SCIARINI, ainsi que BLUM et SMAGGHE que nous avons déjà cités au cours de l'étude des « effets toxiques de la benzidine » ; ces irritations constituent un signe d'alarme de l'exposition à l'amine aromatique et il faut bien remarquer que l'action locale de la benzidine s'accompagne d'une *pénétration en profondeur* qui ne peut que favoriser l'action à distance de l'amine, en particulier au niveau de la vessie. Il est intéressant de rapporter, à ce sujet, l'expérience citée par MEIGS, BROWN et SCIARINI [120] qui ont retrouvé de la benzidine dans l'urine d'un ouvrier ayant volontairement supporté sur l'avant-bras, seulement pendant quarante-huit heures, une gaze imprégnée de benzidine base. Le sujet présentait alors une sévère *dermatose de contact* avec brûlures au lieu d'application. Cette expérience, outre qu'elle met en relief le rôle de la pénétration cutanée, prouve l'importance des phénomènes de dermite comme signes précurseurs, lesquels sont d'autant plus nécessaires à considérer qu'avant l'installation de la tumeur, il n'existe pratiquement que peu d'indications cliniques. En effet, quand l'ouvrier constate une hématurie soudaine, quand il ressent les premières douleurs d'une *cystite hémorragique*, quand il s'aperçoit qu'il urine avec difficulté et quand enfin il se décide à aller trouver son médecin, il est souvent trop tard, du moins pour éviter l'intervention chirurgicale. GOLDBLATT [76] ainsi qu'ABOULKER et SMAGGHE [1] font remarquer que l'hématurie est le plus souvent *intermittente*, même dans le cas de tumeur maligne, et que sa disparition pendant de longues périodes n'indique nullement un arrêt dans le développement des proliférations tumorales. Cette hématurie peut occasionner la formation de « thrombus » dont le passage rend la miction difficile et douloureuse. GOLDBLATT ajoute que la présence de *leucocytes* dans l'urine est fréquente et peut être l'indice d'une ulcération de la tumeur.

Les tumeurs, d'après ABOULKER et SMAGGHE [1], sont la plupart du temps uniques au moment de leur découverte, mais parfois deux ou même davantage ont pu être décelées. Les mêmes auteurs reconnaissent qu'il n'y a pas d'éléments distinctifs entre une tumeur de la vessie sans étiologie précise et une tumeur provoquée par une amine. Le siège de ces tumeurs est variable, et, toujours d'après ces auteurs, il peut se trouver, soit au-dessus des orifices urétraux, soit dans le trigone, soit sur la face latérale. MULLER [124] reconnaît l'existence de tumeurs simples, doubles (la seconde tumeur se trouvant dans la prostate, l'estomac ou les bronches) et même de tumeurs

triples avec localisations supplémentaires dans l'uretère et le rectum ou dans le foie et l'estomac.

Ce même auteur signale, d'autre part, 27 cas de mort par urémie ; il est possible, en effet, parmi les conséquences que peut entraîner l'existence des formes tumorales, que la lyse ou la destruction des cellules cancéreuses, puisse entraîner une accumulation de produits azotés se traduisant par une forte augmentation du taux de l'urée sanguine. Cette constatation est à rapprocher des élévations notables de l'urée sanguine signalées au cours du traitement du cancer de la prostate par des dérivés d'hormones œstrogènes provoquant, au niveau de la tumeur, une lyse rapide des cellules cancéreuses.

B) INTOXICATIONS CHEZ L'ANIMAL

Chez l'Animal, les observations ont été très limitées, les auteurs cherchant surtout à provoquer expérimentalement la formation de tumeurs, sans accorder une importance particulière aux symptômes pouvant précéder ou accompagner le développement des formes tumorales. Nous rappellerons d'ailleurs que SPITZ, MAGUIGAN et DOBRINER, à la suite d'une expérimentation d'une durée de 60 mois sur 7 chiens, dont nous avons déjà examiné en détail le protocole, ont remarqué que la benzidine n'avait provoqué l'apparition d'aucun « signe toxique » chez les animaux.

Personnellement, comme nous le relatons au cours de l'exposé de nos résultats, nous avons noté, chez le Rat soumis à l'intoxication aiguë, une paralysie des membres postérieurs, une tendance nettement accusée vers la perte de l'équilibre et des signes d'asphyxie. Les intoxications subaiguë ou chronique chez les différentes espèces animales (Lapin, Rat, Cobaye, Chien) ne nous ont révélé aucun signe physique particulier ; quant aux signes fonctionnels possibles, leur étude fait l'objet de la quatrième partie de notre travail. Nous signalerons enfin que, chez le Chien intoxiqué chroniquement, nous n'avons que très rarement constaté la présence d'hématies dans les urines.

V. — MODIFICATIONS HISTOLOGIQUES AU NIVEAU DE L'ÉPITHÉLIUM VÉSICAL

Nous limiterons notre exposé à l'étude des modifications histologiques de l'épithélium vésical chez l'Homme.

Nous avons déjà signalé précédemment que les tumeurs vésicales occasionnées par la benzidine ne se différenciaient pas des

tumeurs spontanées de la vessie sans étiologie particulière et qu'elles pouvaient, comme dans le cas de ces dernières, se présenter sous de multiples aspects, tant par leur nombre (parfois deux et même trois) que par leur implantation (tumeurs pédiculées ou sessiles) ou leur siège (l'emplacement le plus habituel étant la région du trigone).

L'analogie persiste quant à la *structure morphologique* des proliférations à partir de laquelle on peut distinguer les *papillomes*, formes bénignes mais considérées communément comme des « états pré-cancéreux » et les « formes malignes » à structure nettement caractéristique.

A) LES PAPILLOMES

MASSON [117] les décrit comme des « masses villeuses » rattachées à la paroi vésicale par une base d'implantation plus ou moins étroite, cette base étant en général constituée par le chorion de la muqueuse.

Chaque *papille* comporte un axe conjonctif grêle richement vascularisé en continuité avec le chorion.

Le revêtement des papilles est de type vésical, mais il diffère du revêtement normal par le fait que les cellules qui le composent sont plus volumineuses et qu'il est plus épais en raison d'une *stratification cellulaire véritable*.

Les cellules sont tantôt polygonales, tantôt étirées perpendiculairement à la base. A l'intérieur de ces cellules, on rencontre des *mitoses* à un niveau quelconque de la stratification. Ces mitoses sont *bipolaires* dans le cas de papillome bénin.

Les papillomes bénins peuvent devenir malins et c'est la raison pour laquelle on les considère comme des états « pré-cancéreux », mais MASSON apporte une restriction à cette idée : il estime que « ce serait une erreur de croire que les cancers vésicaux sont nécessairement précédés par un papillome » et, se référant à certains auteurs, il ajoute que la proportion de cancers consécutifs à un papillome ne dépasserait pas 30 à 36 %. Les autres seraient des cancers d'emblée développés.

B) LES FORMES MALIGNES

Toujours d'après MASSON, le passage d'une forme bénigne à une forme maligne est souvent difficile à apprécier du fait que les prélèvements effectués en vue de l'étude histologique n'intéressent que la région superficielle de la tumeur. Mais un examen microscopique

des *assises profondes* des *épithéliomas papillaires*, révèle la présence de cellules contrastant avec les cellules voisines par leurs *grandes dimensions* et par leurs *noyaux géants, hyperchromatiques et difformes*. L'auteur ajoute que la base de la tumeur, surtout, est importante à étudier pour affirmer le diagnostic ; le fond des « *recessus* » épithéliaux interpapillaires est situé entre des *faisceaux musculaires* et l'on y rencontre des cordons métaplasiques épidermoïdes à éléments plus ou moins différenciés.

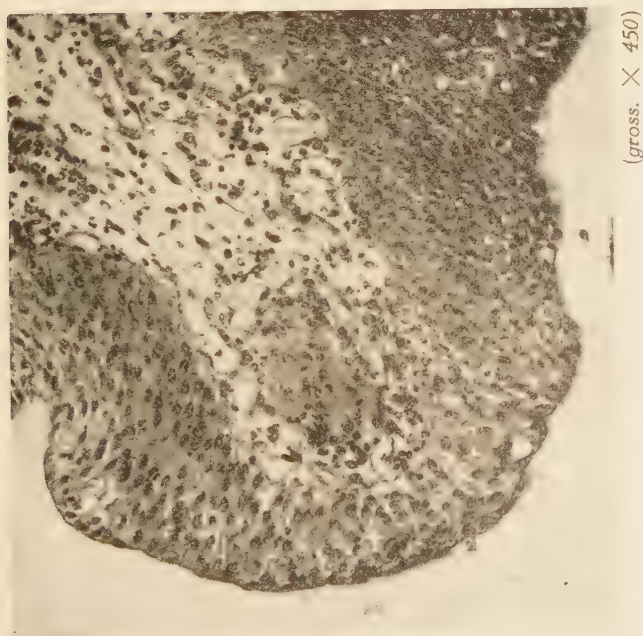
Cette structure microscopique a permis à certains de classer les tumeurs en différents groupes. C'est ainsi que WILLIS [187] distingue 5 sortes de proliférations suivant le degré d'organisation cellulaire depuis le « papillome vilieux hautement organisé » jusqu'à « l'adénocarcinome mucoïde ».

D'autres, comme ANDERSON [5], considèrent à la fois l'aspect extérieur et la structure de la tumeur pour établir une classification. Ce dernier auteur envisage trois types de tumeurs, qu'il décrit ainsi :

- a) tumeurs « molles » en « chou-fleur », aux cellules de transition différenciées, aux noyaux uniformes avec peu de mitoses ;
- b) tumeurs « fermes, lisses, d'aspect noduleux », aux noyaux hyperchromatiques et plus riches en mitoses ;
- c) tumeurs « rugueuses, aplaties et ulcéreuses », aux noyaux très riches en mitoses.

Nous terminerons en disant que cette structure anarchique, en particulier au niveau du noyau, se retrouve dans les complications « par contiguïté », ou *métastases*, pouvant atteindre les organes voisins de la vessie, tels que les uretères, la prostate et le rectum pour ne citer que les plus fréquemment touchés.

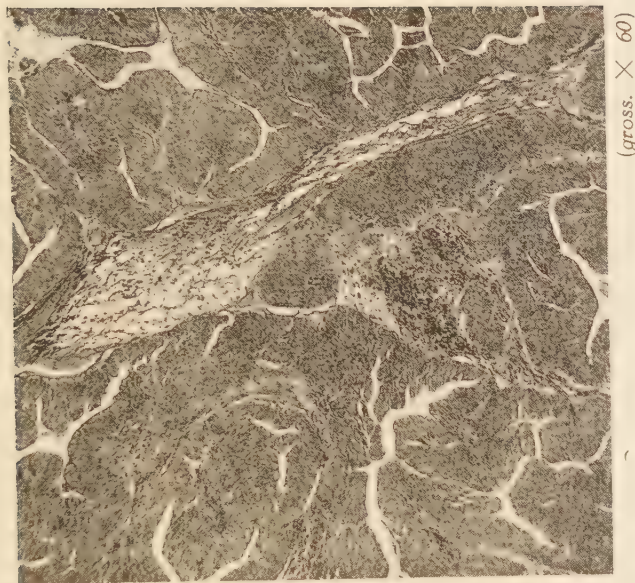
Pour illustrer ce texte, nous présentons, sur la page ci-contre, deux photographies de coupes histologiques de l'épithélium vésical, l'une concernant un papillome vésical, l'autre relative à une cancérisation de la vessie. L'interprétation anatomo-pathologique nous a été donnée par le Docteur F. LOISILLIER, Assistant à l'Institut de Recherches sur le Cancer du Centre National de la Recherche Scientifique, que nous sommes heureux de remercier ici.



(gross. $\times 450$)

FIGURE 1

Papillome vésical : la pluri-stratification et la différenciation sont nettement visibles. Coexistence d'éléments inflammatoires.



(gross. $\times 60$)

FIGURE 2

— A droite, antécédents d'un papillome vésical.
— A la partie centrale et à gauche, envahissement en profondeur du tissu conjonctif traduisant une cancérisation de la lésion.

CHAPITRE SIXIEME

TRAITEMENT ET PRÉVENTION DES INTOXICATIONS PAR LA BENZIDINE

Nous exposerons brièvement les quelques moyens de traitement, mais nous nous attarderons davantage sur les mesures de prophylaxie qui nous semblent les plus importantes, avant de terminer par l'exposé de quelques textes législatifs.

I. — TRAITEMENT

Le traitement est le même que celui des cancers de la vessie en général. Il est d'autant plus efficace qu'il est entrepris de bonne heure, ce qui confirme la nécessité d'un diagnostic précoce. ABOULKER et SMAGGHE [1] citent surtout comme moyens de traitement *l'électrocoagulation* et la *cystectomie partielle et même totale*, moyens déjà envisagés par GOLDBLATT [76] et MULLER [125].

En cas de simple contact cutané, certains, et en particulier SAX [148], recommandent simplement un lavage immédiat de la peau avec beaucoup d'eau et de savon et, s'il s'agit de poussières ayant souillé les yeux, une longue aspersion de ces derniers avec de l'eau pure ou mieux avec une solution glucosée.

II. — PROPHYLAXIE

Comme il est de règle en Hygiène industrielle, il faut distinguer, d'une part, une prophylaxie individuelle, d'autre part, une prophylaxie collective intéressant en particulier les locaux de travail et les modes de fabrication.

A) PROPHYLAXIE INDIVIDUELLE

Nous avons insisté sur le rôle prépondérant de la peau dans la pénétration de la benzidine ; aussi la prophylaxie individuelle réside-t-elle surtout dans les soins que doit apporter l'ouvrier lui-même à son *hygiène corporelle* et à ses *vêtements*. Une douche à la fin de la journée de travail, le brossage doux des mains, en particulier des ongles avant les repas, le port de vêtements de travail, l'obligation, dans certaines conditions de manipulation, de se munir d'un masque, sont autant de précautions en apparence élémentaires mais certainement efficaces pour soustraire l'organisme à l'absorption quotidienne de micro-doses de toxique, si nocives à longue échéance.

Sur le plan médical, les médecins du travail soulignent de plus en plus l'intérêt du dépistage qui consiste à soumettre chaque individu susceptible d'être contaminé par l'amine cancérigène, à des *examens médicaux périodiques*. Ces examens, comme l'indiquent, entre autres, ABOULKER et SMAGGHE [1], MULLER [125], BARSOTTI et VIGLIANI [15], comprennent, d'une part, des analyses d'urines tous les trois mois, d'autre part, une cystoscopie régulière, au moins une fois par an pour tous les ouvriers exposés.

L'analyse d'urine consiste à rechercher les *hématies*, mais nous avons vu que l'hématurie pouvait être intermittente, même dans le cas de tumeur maligne (ABOULKER et SMAGGHE). Pour HUGUENIN [91], cependant, l'hématurie reste le symptôme révélateur.

Quant à la *cystoscopie*, les auteurs s'accordent pour lui donner la première place ; malheureusement, cet examen délicat, bien que primordial, n'encourt pas toujours la faveur des ouvriers, en raison de son caractère désagréable. DESOILLE [45] va jusqu'à proposer des « primes » à la cystoscopie, afin d'encourager l'ouvrier à se soumettre à un examen nécessaire à la préservation de sa santé. Les résultats sont pourtant probants, puisque MULLER [125] signale que, grâce à ces précautions, les cas graves disparaissent et les cas initiaux sont découverts et soignés de bonne heure, ce qui se traduit par une diminution, toujours d'après l'auteur, de 57 à 32 % des cancers vésicaux.

Sur le plan chimique ou analytique, on recherchera la benzidine ou ses formes d'élimination dans l'urine des ouvriers et même, comme l'indiquent BOYLAND, WALLACE et WILLIAMS [29], on déterminera l'activité de la β -glucuronidase, qui, d'après les auteurs, est spécifiquement élevée dans les cas de cancer de la vessie, intervenant pour libérer les molécules actives de leurs conjugués glucuroniques. Des examens et même des dosages pourront être aussi pratiqués sur les vêtements de travail des ouvriers.

Sur un plan plus particulier, il n'est peut-être pas sans intérêt de signaler que NEISH [127] a trouvé que la caféine, dont on connaît

le pouvoir solubilisant vis-à-vis des hydrocarbures polycycliques cancérogènes, augmentait également la solubilité dans l'eau des amines cancérogènes parmi lesquelles la benzidine. Sur la base de ces constatations, la consommation par l'ouvrier de boissons telles que le café ou le thé, serait à recommander pour favoriser l'élimination du toxique.

Enfin, considérant l'augmentation de l'excrétion de vitamine C provoquée, selon EKMAN [58], par la benzidine administrée en injection, on peut envisager, au moins dans une certaine mesure, l'éventualité d'un rôle préventif de l'acide ascorbique. Nous nous proposons d'étudier ultérieurement ce point particulier.

B) PROPHYLAXIE COLLECTIVE

Les règles d'hygiène individuelle ne sont pas toujours respectées par l'ouvrier ; aussi est-il nécessaire que ce dernier soit, à chaque stade de son travail, protégé de tout contact avec l'amine qu'il manipule, d'où l'attention à accorder aux modifications éventuelles des modes de fabrication et à l'assainissement des locaux de travail.

1. MODES DE FABRICATION

Les auteurs s'accordent pour attacher une très grosse importance aux modes de fabrication. SCOTT et WILLIAMS [154], après avoir rappelé que les risques de contamination existent dès la transformation de l'hydrazobenzène en benzidine, écrivent : « Dans certaines usines où les procédés de réduction du nitrobenzène en hydrazobenzène, puis de conversion de ce dernier en benzidine, ont été entièrement séparés, on n'a décelé aucune tumeur parmi les ouvriers effectuant la réduction, alors qu'on a découvert de nombreuses proliférations vésicales chez les ouvriers chargés de la préparation et de l'isolement de la benzidine elle-même. Quand la "réduction" et la "conversion" sont réalisées dans le même bâtiment, il est nécessaire d'être extrêmement prudent. Que la réduction soit effectuée par la poudre de zinc, l'amalgame de sodium ou par électrolyse, on s'efforcera d'opérer dans du matériel *hermétiquement clos*, qu'il s'agisse des *filtres* ou *presses* pour isoler l'hydrazobenzène ou des *réipients* pour effectuer la "transformation en benzidine". La *distillation* de la benzidine et la récupération de la base sous une forme solide constituent des causes de pollution de l'atmosphère par les vapeurs, causes qui peuvent être évitées en isolant le produit final sous forme de sel. »

A ce sujet, nous croyons utile de préciser l'intérêt que présentent les manipulations de la benzidine sous forme de chlorhydrate ou de sulfate. Ce dernier sel est considéré comme inoffensif, en raison de

son insolubilité, par BELLESINI [16], qui décrit une méthode de fabrication employée depuis plus de 15 années en Italie du Nord et au cours de laquelle l'ouvrier est en contact seulement avec le sulfate de benzidine : aucun cas de tumeur n'a été décelé pendant cette période. L'importance de la salification a été aussi soulignée, nous l'avons vu, par MULLER. Mais SCOTT et WILLIAMS voient surtout dans l'emploi des sels de benzidine un moyen pour éviter la production de vapeurs susceptibles de contaminer l'atmosphère des locaux de travail, sans toutefois exclure les risques de contamination par absorption cutanée ; et ces auteurs de conclure : « Les sels de benzidine sont facilement absorbés par la peau ; ils ne sont pas moins dangereux que la base et l'on a découvert des tumeurs chez les ouvriers manipulant ces sels. C'est pourquoi, lors des opérations de manutention ou de stockage, on évitera tout contact de la peau avec la benzidine base ou ses sels en utilisant des moyens appropriés. »

2. LOCAUX DE TRAVAIL

Outre les précautions apportées à la fabrication de la benzidine, on veillera tout particulièrement à l'aération des locaux de travail, afin d'éviter la stagnation de *poussières* pouvant provenir, soit d'une manutention sans soins, soit d'appareils à marche défectueuse. Enfin, il semble utile de veiller à ce que la *température* des locaux ne soit pas trop élevée.

III. — LÉGISLATION

Tant à l'étranger qu'en France, des textes de loi ou des décrets réglementent les travaux industriels susceptibles de provoquer l'intoxication des ouvriers par les *amines aromatiques*.

Nous avons jugé utile de reproduire, ci-après, un tableau inscrit par décret du 9 décembre 1950 (J.O. du 13 décembre 1950) pris en application de la loi du 30 octobre 1946 sur la prévention et la réparation des accidents du travail et des maladies professionnelles.

MALADIES PROFESSIONNELLES
PROVOQUEES PAR LES AMINES AROMATIQUES

Aniline et homologues; phénylhydrazine; benzidine et homologues; phénylènediamines et homologues; aminophénols et leurs éthers; naphtylamines et homologues ainsi que les dérivés chlorés, nitrosés, nitrés, sulfonés des produits qui précèdent.

MALADIES ENGENDRÉES PAR L'ANILINE et les autres amines aromatiques ci-dessus mentionnées	DÉLAI de prise en charge	LISTE INDICATIVE des principaux travaux susceptibles de provoquer ces maladies
Accidents aigus (manifestations nerveuses avec cyanose)	5 jours	Préparation, emploi, manipulation des amines aromatiques, notamment :
Anémie avec cyanose et subictère .	6 mois	Fabrication de l'aniline et autres amines aromatiques.
Dermatoses aiguës récidivantes ou chroniques	30 jours	Préparation, au moyen d'amines aromatiques, de produits chimiques, matières colorantes, produits pharmaceutiques, accélérateurs de vulcanisation du caoutchouc, etc...
Cystite aiguë hémorragique	30 jours	Teinture des fils, tissus, fourrures, cuirs, etc., en noir d'aniline ou autres colorants développés sur fibre.
Lésions vésicales imputables notamment aux naphtylamines et à la benzidine (congestions vésicales avec varicosités, tumeurs bénignes sessiles ou pédiculées, tumeurs malignes confirmées par la cystoscopie)	15 ans (*)	Teinture de cheveux au moyen de produits à base de paraphénylène-diamine ou homologues.

(*) C'est à juste titre que le délai de prise en charge a été augmenté de 5 ans à 15 ans par le décret mentionné.

Méthodes de caractérisation et de dosage de la Benzidine dans les milieux complexes



- Exposé des méthodes antérieurement proposées
- Exposé d'une méthode personnelle

L'importance des méfaits causés par la benzidine et la nécessité d'appliquer des mesures de prévention efficaces ont amené les hygiénistes et les biologistes à établir des méthodes de détection et de dosage de cette amine dans une série de « milieux » aussi complexes que différents (atmosphères, vêtements, milieux biologiques, etc.) en utilisant des méthodes chimiques ou des méthodes chromatographiques.

Nous procéderons tout d'abord, dans un premier chapitre, à l'exposé, puis à l'examen des méthodes qui ont déjà été préconisées soit pour le dosage de la benzidine, dans les atmosphères, ou dans les milieux biologiques, soit pour sa séparation des autres amines industrielles.

Nous exposerons ensuite, dans un second chapitre, une technique que nous avons personnellement mise au point et que nous avons surtout utilisée pour notre étude biologique des intoxications par la benzidine.

CHAPITRE PREMIER

EXPOSÉ DES MÉTHODES DÉJÀ PROPOSÉES POUR LE DOSAGE OU L'ISOLEMENT DE LA BENZIDINE

Nous passerons sous silence les méthodes dont la sensibilité trop faible ne permet pas d'envisager l'application en hygiène industrielle. Par ailleurs, nous nous limiterons aux méthodes qui ont été effectivement utilisées pour le dosage ou la séparation de la benzidine dans les atmosphères des lieux de travail ou dans les milieux biologiques.

Pour la clarté de l'exposé, nous avons divisé les méthodes proposées en trois groupes : méthodes pondérales, méthodes colorimétriques et méthodes chromatographiques.

I. — MÉTHODES PONDÉRALES

Il n'en existe, à vrai dire, actuellement qu'un seul exemple, que nous rappellerons à titre historique ; il est dû à ADLER [4] qui a tenté en 1909, sinon de doser, du moins d'isoler, sous forme de sulfate, la benzidine du sédiment des urines de lapins ayant reçu 0,40 g d'amine par jour, par voie buccale. En réalité, ADLER avait isolé ainsi un résidu constitué par une benzidine hydroxylée dont nous reparlerons quand nous étudierons les formes d'élimination de l'amine dans l'urine.

II. — MÉTHODES COLORIMÉTRIQUES

Ces méthodes sont basées sur des réactions soit d'oxydation, soit de diazotation, soit de condensation.

A) MÉTHODES D'OXYDATION

Nous n'en citerons que deux, la seconde étant de loin la plus importante.

1) METHODE UTILISANT LE CHLORURE FERRIQUE

Elle est une adaptation de la réaction de WITT proposée en 1939 par BYKHOVSKAYA [34] pour le dosage colorimétrique des vapeurs de nitrobenzène, azobenzène, aniline et benzidine dans l'air. La technique utilisée par cet auteur consiste à recueillir dans l'eau les vapeurs de benzidine et à appliquer ensuite la réaction au chlorure ferrique qui donne une coloration verte.

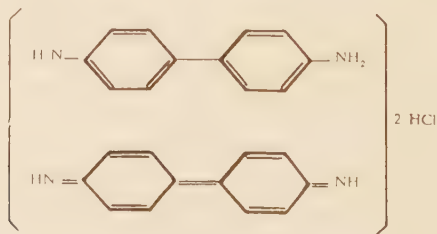
2) METHODES UTILISANT LA CHLORAMINE T

Ce sont les plus utilisées ; elles sont basées sur la formation d'un produit d'oxydation jaune, soluble dans un solvant organique, quand on traite une solution acide de benzidine par la chloramine T.

Deux techniques principales ont été proposées, la première par GLASMAN et coll. [75] qui extraient le colorant jaune par l'éther, la seconde par GAGE [71] et par BUTT et STRAFFORD [33] qui utilisent le chloroforme comme solvant du complexe coloré.

a) TECHNIQUE DE GLASMAN, MEIGS, BROWN et SCIARINI

— *Principe* : Les extraits étherés des urines d'ouvriers ou les prélèvements d'air effectués à l'aide de barboteurs sont traités par un excès de chloramine T en milieu légèrement chlorhydrique. La coloration jaune ainsi formée se prête à un dosage colorimétrique. D'après SCHRENK et KNORR [152], ce complexe coloré serait constitué par une molécule de benzidine, une molécule de l'imine correspondante et deux molécules d'acide.



α) Application de la méthode à l'urine

— *Extraction* : 60 ml d'urine sont amenés, par quelques gouttes d'hydroxyde de sodium, à un pH voisin de 8,5 et centrifugés pendant une demi-heure à 3.000 tours/minute. 50 ml de cette urine sont, après centrifugation, introduits dans une ampoule à décantation et agités mécaniquement avec 150 ml d'éther ou d'acétate d'éthyle (SCIA-RINI) pendant 5 minutes.

La phase aqueuse est soutirée et l'éther lavé une fois avec une solution tampon (chlorure de potassium — acide borique) à pH 8,4.

L'éther d'extraction, additionné de celui ayant servi au lavage de l'ampoule à décantation, est concentré par distillation sous pression réduite à un volume de 1 ml.

— *Dosage proprement dit* : Après refroidissement, on ajoute, dans l'ordre, les réactifs suivants :

- 1 ml d'acide chlorhydrique 5,75 N ;
- 1 ml d'eau distillée ;
- 1 ml de chloramine T à 10 % dans l'eau distillée ;
- 5 ml d'éther.

Les liquides sont agités pendant environ 10 minutes et transvasés dans une ampoule à décantation. Le récipient est lavé avec 5 ml d'éther qui sont ensuite introduits dans l'ampoule à décantation. La coloration jaune produite passe dans l'éther qui, après séparation de la phase aqueuse, laquelle doit être parfaitement incolore, est ajusté à un volume de 10 ml. La lecture se fait immédiatement au photomètre en utilisant un filtre bleu à 440 mμ ; le résultat, rapporté à une courbe d'étalonnage établie selon la même technique avec des doses croissantes de 5 à 25 μg de benzidine, ou de ses dérivés, donne la quantité d'amine contenue dans la prise d'essai.

Purification de la benzidine utilisée

La benzidine utilisée pour l'établissement de la courbe d'étalonnage est purifiée selon les techniques modifiées de BING [22] et de POWER et WAKEFIELD [135] : la base déplacée de son chlorhydrate par l'hydroxyde de sodium est dissoute dans l'alcool à 70° C chaud : les cristaux qui se forment par refroidissement sont lavés avec de l'alcool à 50° froid et redissous dans l'alcool à 70° en présence de charbon actif ; le mélange est chauffé et filtré à chaud. Une troisième cristallisation donne un produit pur que l'on sèche pendant plusieurs jours à l'obscurité.

β) Application de la méthode aux atmosphères

Les amines susceptibles de se trouver dans l'atmosphère sont captées dans des barboteurs contenant 100 ml d'eau distillée et fonctionnant à la vitesse d'environ 30 litres par minute. Les prélèvements sont traités de la même façon que l'urine en éliminant bien entendu la centrifugation.

b) TECHNIQUE DE GAGE

— *Principe* : Récemment GAGE [71], arguant du fait que la benzidine base n'est plus utilisée dans les manufactures, a proposé à la Commission Internationale de Toxicologie et d'Hygiène industrielle une modification de la méthode à la « chloramine T » pour le dosage du chlorhydrate de benzidine *dans les atmosphères*. La différence entre cette technique et la méthode de GLASSMAN, dont elle est inspirée, consiste en l'extraction du colorant jaune produit, non plus par l'éther, mais par le *chloroforme* dans lequel ce colorant est aussi très soluble. Outre l'intérêt d'une manipulation plus aisée et plus rapide, elle présente le gros avantage d'être *spécifique des dérivés du diphényle, diaminés en para, et para'*.

— *Prélèvement* : Il s'effectue en faisant passer l'air à raison de 5 litres par minute dans un « tube absorbant » contenant 25 ml d'acide chlorhydrique N/10. Quand le volume d'air testé atteint 300 litres, soit au bout d'une heure environ, le contenu du tube est transvasé dans une ampoule à décantation où il est complété à 50 ml par 15 ml d'acide chlorhydrique 0,5 N et 10 ml d'eau distillée ayant servi à laver le barboteur.

— *Dosage proprement dit* : Il est alors ajouté successivement 1 ml de la solution de chloramine T, puis, après 5 minutes, 5 ml de chloroforme. Par agitation, la coloration jaune passe dans la phase chloroformique qui est soutirée ; on répète l'extraction avec deux autres portions, chacune de 2 ml de chloroforme, qui sont jointes aux 5 premiers ml, et, après avoir ajusté le volume à 10 ml et éventuellement clarifié la solution par le sulfate de sodium anhydre, on mesure l'intensité de la coloration. Si l'on utilise une gamme témoin, cette gamme peut être préparée en suivant la technique décrite ci-dessus ou bien à partir d'une solution de bichromate de potassium qui présente le gros intérêt d'une conservation pratiquement indéfinie. Il est à noter que le troisième extrait chloroformique ne doit plus être coloré, sinon il est nécessaire de continuer l'extraction jusqu'à décoloration totale.

En appliquant cette technique, l'auteur a pu évaluer 15 μg de benzidine base par m^3 d'air, ce qui est le maximum de concentration tolérable recommandé par le « I.C.I. Industrial Products and Health

Research Committee ». Rappelons à ce sujet que celui admis par la Commission de Toxicologie et d'Hygiène industrielle de l'I.U.P.A.C. est seulement de 10 μg par m^3 .

c) TECHNIQUE DE BUTT ET STRAFFORD

La méthode à la chloramine T, modifiée par GAGE, a été appliquée par BUTT et STRAFFORD au dosage de la benzidine, non seulement dans les atmosphères, mais aussi dans les vêtements et les dépôts industriels. L'originalité de cette technique réside surtout dans les modes de prélèvement.

α) Dosage dans les atmosphères

— *Prélèvements* : Les auteurs distinguent trois sortes de prélèvements :

- absorption dans l'acide chlorhydrique N/10 ;
- absorption sur papier filtre Whatman ;
- récolte dans un récipient.

— *Absorption dans l'acide chlorhydrique N/10* :

Ce premier mode de prélèvement est surtout satisfaisant pour les atmosphères contenant en majeure partie des poussières de benzidine ou de ses sels. On met en série deux barboteurs du type proposé par GAGE, contenant chacun 15 ml d'acide chlorhydrique N/10, et on provoque l'aspiration par une trompe à vide dont on règle le débit à un rythme compris entre 5 et 10 litres par minute. Au bout d'un temps déterminé, on calcule en litres le volume d'air prélevé (de l'ordre de 100 litres) et on dose la benzidine dans chacun des barboteurs. Les auteurs font remarquer que la technique est inapplicable lorsqu'il s'agit d'aérosols, produits, par exemple, par le passage de l'air sur de la benzidine en fusion, qui sont mal retenus par l'acide chlorhydrique N/10 ; ils conseillent, dans ce cas, de récolter la benzidine sur un papier filtre.

— *Absorption sur papier filtre* :

Si, dans le prélèvement précédent, la benzidine contenue dans le second barboteur s'élève à plus de 20 % de la totalité de la benzidine prélevée, il faut faire passer l'air sur une feuille de papier filtre Whatman n° 4 maintenue dans un support suivant les techniques décrites dans les méthodes du « Department of Scientific and Industrial Research », pour la détection des gaz toxiques dans l'industrie. On opère de la même façon que précédemment, le papier filtre remplaçant les deux barboteurs. Pour le dosage de la benzidine, le papier est extrait à chaud par de petites portions d'acide chlorhydrique N/5.

— *Récolte de la benzidine dans un récipient :*

Les poussières de benzidine se trouvant dans l'atmosphère sont recueillies dans un récipient d'environ 20 cm de diamètre. Il suffit, pour cela, d'exposer ce dernier à l'endroit désiré et, après un certain temps d'exposition, de le laver avec 25 ml d'acide chlorhydrique N/10 à partir desquels on dosera la benzidine.

β) Dosage dans les vêtements

— *L'extraction* de la benzidine imprégnant les vêtements s'effectue à partir d'une parcelle d'environ 2 g de tissu, alcalinisée par quelques centimètres cubes de potasse alcoolique 2N, puis épuisée par 100 ml d'éther pendant deux heures, dans un appareil de Soxhlet. La solution éthérée ainsi obtenue est alors elle-même extraite dans une ampoule à décantation par 75 ml d'acide chlorhydrique N/5. Si, au cours de l'extraction, l'éther a entraîné certains colorants du tissu, il est nécessaire, avant de pratiquer le dosage, d'extraire à plusieurs reprises, par quelques centimètres cubes de chloroforme, cette dernière solution chlorhydrique contenant la benzidine, afin d'éliminer les colorations parasites.

γ) Dosage dans les dépôts industriels

Une prise d'essai, constituée soit par des résidus, soit par des solutions ou des produits de réactions intermédiaires, pouvant varier de quelques milligrammes à quelques grammes suivant la concentration supposée en benzidine, est dissoute, mélangée ou mise en suspension dans 50 ml d'eau alcalinisée par CO_3Na_2 , d'où elle est extraite, d'abord par 75 ml d'éther, puis à partir de la solution éthérée par 100 ml d'acide chlorhydrique dilué. Les dosages proprement dits s'effectuent sur les solutions chlorhydriques obtenues à la suite des différents prélèvements conformément à la technique de GAGE que nous avons exposée précédemment.

B) MÉTHODES DE DIAZOTATION

Ainsi que nous l'avons vu au cours de l'étude des propriétés chimiques de la benzidine, les deux groupements NH_2 de cette diamine se prêtent facilement à la formation d'azoïques colorés.

Deux méthodes, mettant à profit cette propriété et différant l'une de l'autre par la nature de l'*agent copulant*, ont été utilisées :

— La méthode, employée par BAKER et DEIGHTON [11] pour le dosage de la benzidine dans les milieux biologiques, basée sur

la copulation du diazoïque de la benzidine avec le sel de sodium de l'acide naphthol-2 disulfonique-3, 6, en milieu ammoniacal.

- La méthode de BUTT et STRAFFORD [33], spécialement appliquée aux atmosphères, qui utilise comme agent de copulation l'acide hydroxy-3 naphthoïque-2.

1. MÉTHODE DE BAKER et DEIGHTON

Cette méthode est inspirée de celle de WESTFALL [183] pour le dosage de l'amino-2 fluorène dans les milieux biologiques et de la modification apportée par GUTMAN et coll. [78].

— *Principe* : La benzidine est diazotée en milieu acide par une solution 0,029 M de nitrite de sodium, puis le diazoïque obtenu est copulé, en milieu ammoniacal, avec le sel de sodium de l'acide naphthol-2 disulfonique-3, 6. La densité optique de la solution colorée est déterminée photométriquement.

Application aux milieux biologiques et particulièrement aux tissus animaux

Les échantillons de tissus ou d'organes, fraîchement prélevés et pesés, sont broyés au mortier de verre en présence de sable fin. On les extrait alors par un volume d'acétone égal à neuf fois le poids du tissu et on filtre après 20 minutes de contact. Le résidu est lavé à deux reprises par 2 volumes d'acétone et les filtrats réunis sont évaporés à une température inférieure à 65°.

Après évaporation, on reprend le résidu dans le minimum d'acide acétique cristallisable, à douce température, et on complète à 10 ml avec de l'eau distillée. Après refroidissement et filtration, on dose les groupes aminés diazotables libres. Pour évaluer la benzidine conjuguée, il suffit d'effectuer une hydrolyse acide selon la méthode de WESTFALL et MORRIS [184] en plaçant dans un bain-marie à 80°, pendant une heure, l'extrait acétique précédent.

Grâce à cette méthode, BAKER a pu effectuer une répartition de la benzidine dans les principaux organes du Rat.

2. MÉTHODE DE BUTT ET STRAFFORD

Concurremment à l'utilisation de la méthode modifiée à la chloramine T, que nous avons déjà exposée, BUTT et STRAFFORD proposent la copulation du bis-diazoïque de la benzidine avec l'acide hydroxy-3 naphthoïque-2 à 0,6 % dans une solution M de carbonate de sodium.

— *Principe* : Après neutralisation par une solution moléculaire de carbonate de sodium, le liquide contenant la benzidine (d'un volume compris entre 25 et 50 ml) est acidifié par 2 ml d'acide chlorhydrique N en présence de bromure de potassium. On ajoute alors au mélange refroidi dans la glace fondante 0,4 ml d'une solution M/2 de nitrite de sodium et on laisse au repos 15 minutes. L'excès d'acide nitreux, mis en évidence à l'aide d'un papier à l'iodure de potassium, est éliminé par 1 ml d'une solution à 3 % d'acide sulfamique. Le tétra-zoïque ainsi formé est copulé avec 1 ml de la solution d'acide hydroxy-naphtoïque. Après 30 minutes, la coloration développée est extraite par le chloroforme en milieu sulfurique et c'est sur l'extrait chloroformique complété à 25 ml que s'effectue la lecture colorimétrique, soit dans les tubes de Nessler, soit à l'aide d'un photomètre. Les résultats sont calculés par comparaison à une gamme témoin ou à l'aide d'une courbe d'étalonnage.

— *Applications de la méthode* : Cette méthode s'applique comme celle à la chloramine T au dosage de la benzidine dans les *atmosphères* et, à condition que cette amine soit seule présente, dans les *vêtements*, ou dans les *résidus industriels* ; les modes de prélèvements sont les mêmes que ceux précédemment exposés pour la technique à la chloramine T.

C) MÉTHODE BASÉE SUR LA FORMATION D'UN COMPLEXE COLORÉ

Nous avons vu, au cours de l'étude des propriétés chimiques de la benzidine, que cette dernière pouvait donner des complexes colorés par combinaison directe avec certains produits de la série des quinones.

Ainsi, l'action du sel de sodium de l'acide naphtoquinone-1,2 sulfonique-4 sur la benzidine se traduit par la formation d'un complexe coloré en rouge se prêtant à un dosage colorimétrique. Cette réaction a été mise à profit par FOLIN [69] pour le dosage des acides aminés dans l'urine. ENGELBERTZ et BABEL [60] l'ont adaptée au dosage de la benzidine et de ses métabolites dans les urines et dans les viscères.

— *Principe* : La technique d'ENGELBERTZ et BABEL est essentiellement basée sur des *procédés d'isolement* originaux : d'une part, des extractions sélectives, à des pH bien déterminés afin d'éliminer les acides aminés parasites des milieux biologiques, d'autre part, séparation par « solubilités différentielles » de la benzidine et de son dérivé

monoacétylé, donnant tous deux avec le sel de *potassium* de l'acide naphtoquinone-1.2 sulfonique-4 un complexe rose, lequel, pour la benzidine base, est soluble dans l'éther méthylique du métacrésol et, pour la mono-acétylbenzidine, soluble dans la pyridine. Dans les mêmes conditions, le dérivé diacétylé ne donne aucune coloration, mais peut être évalué après saponification.

— *Applications* : Les auteurs ont appliqué leur technique à l'étude de l'élimination urinaire de la benzidine (et de ses métabolites acétylés) chez l'Homme et différentes espèces animales. Nous en reparlons dans la cinquième partie de notre travail.

La sensibilité de cette méthode serait de :

— 1 p. 3.000.000 pour la benzidine ;

— et de 1 p. 700.000 pour la mono-acétyl-benzidine.

III. — MÉTHODES CHROMATOGRAPHIQUES

La similitude d'un grand nombre de réactions chimiques de la benzidine, d'une part avec les autres amines industrielles manipulées dans les mêmes locaux, d'autre part avec ses isomères, ses produits de substitution ou ses métabolites, a incité les chimistes toxicologues à utiliser les *techniques chromatographiques* pour la détection, la séparation et même l'évaluation semi-quantitative du p.p' diamino-biphényle dans les milieux complexes.

Nous avons retenu une technique basée sur la chromatographie circulaire et deux autres utilisant la chromatographie descendante.

A) CHROMATOGRAPHIE CIRCULAIRE

(TECHNIQUE DE BUTT ET STRAFFORD)

— *Principe* : Nous avons vu, en exposant la méthode d'ENGELBERTZ et BABEL que le dérivé sulfoné en 4 de la naphtoquinone-1.2 réagissait sur les amines en formant un complexe coloré. BUTT et STRAFFORD [33] soumettent ce dérivé coloré à une chromatographie circulaire sur papier Whatman entre deux plaques de verre.

— *Application* : La technique qui est destinée à être appliquée à des mélanges d'amines contenant de la benzidine, comporte deux temps :

- 1° Evaluation approximative des amines aromatiques présentes ;
- 2° Détection et évaluation semi-quantitative de la benzidine.

1. EVALUATION APPROXIMATIVE DES AMINES AROMATIQUES

Cette évaluation peut se faire :

- soit par titrage à l'aide d'une solution de nitrite de sodium en utilisant comme indicateur externe un papier imprégné d'iodure de potassium et d'empois d'amidon ;
- soit colorimétriquement par les méthodes à la chloramine T ou à l'acide hydroxy-naphtoïque que nous avons exposées plus haut.

2. DÉTECTION ET ESTIMATION SEMI-QUANTITATIVE DE LA BENZIDINE

En tenant compte des résultats précédents, on peut calculer le volume de solution à analyser équivalant à 1 mg de benzidine. A cette partie aliquote introduite dans un tube à essais, on ajoutera 2 ml d'une solution à 0,7 g p. 100 du dérivé sulfoné de la naphtoquinone-1-2 dans un mélange tamponné à pH 7,5 (véronal sodique, acide chlorhydrique N/10). Au bout de 5 minutes, 1 ml de la solution est introduit, à l'aide d'une pipette, dans l'orifice pratiqué au milieu de la plaque de verre supérieure. Lorsque la solution a bien imprégné le papier, on obture l'orifice à l'aide d'un bouchon de caoutchouc traversé par un tube en verre dont l'extrémité est appliquée au centre du papier. Dans ce tube, on verse une solution d'hydroxyde de sodium N/10 saturée d'alcool butylique, qui, par capillarité, diffuse à travers le papier, en entraînant les différents composants colorés apportés par la solution. A la fin de l'opération, c'est-à-dire lorsque le liquide aura presque atteint les bords du cercle de papier, le chromatogramme est retiré, séché, puis comparé à un essai témoin effectué avec des quantités connues d'amines. Si l'on connaît l'identité des amines coexistant avec la benzidine dans la prise d'essai, on préparera une série de chromatogrammes à partir de mélanges en proportions connues de benzidine et des autres amines présumées.

Dans ces conditions, le « spot » de la benzidine se présente sous forme d'une « plage » composée d'un front étroit, de couleur rouge pourpre et d'une bande diffuse. Les « spots » de la dianisidine, de l'ortho-tolidine, de la dichloro-3-3'-benzidine, de la diphényline (diamino-2-4' biphenyle) et de l'aniline, donnent respectivement des « plages » pourpre, rouge, pourpre, brun-rouge et orange.

D'après les auteurs, cette méthode permet de détecter 5 parties de benzidine dans 100 parties d'amines.

B) CHROMATOGRAPHIE DESCENDANTE

La chromatographie descendante a été utilisée, d'une part, par GASPARIC, PETRANEK et VECERA [72] pour la séparation et l'identification de la benzidine et de ses isomères dans des mélanges, d'autre part, par les spécialistes polonaises CHWAT et ADER [40] pour la séparation et l'identification de la benzidine et de ses homologues dans l'urine.

1. TECHNIQUE DE GASPARIC, PETRANEK et VECERA

— *Principe* : La benzidine et ses isomères sont chromatographiés sur papier Whatman n° 4 plongé au préalable dans une solution alcoolique de formamide et séché à l'air. Parmi les nombreux solvants essayés, les auteurs ont retenu le mélange de formamide et de cyclohexane. Les révélateurs utilisés sont soit une solution alcoolique de p. diméthyl-amino-benzaldéhyde, soit, après une diazotation sur papier par une solution de nitrite de sodium, l' α -naphtyléthylènediamine.

— *Application* : Les produits essayés sont à l'état de bases en solution alcoolique à 0,5 p. 100. Chaque spot correspond à 2 ml de solution. La vitesse de migration du solvant est d'environ 2 heures pour un parcours de 30 cm à la température de 23°.

Nous reproduisons dans le *tableau III* ci-après, les résultats obtenus par les auteurs.

TABLEAU III
(d'après GASPARIC, PETRANEK et VECERA)

SUBSTANCE	Rf à 23°	P. DIMÉTHYLAMINO- BENZALDÉHYDE		NAPHTYLÉTHYLÈNE- DIAMINE	
		Couleur	Quantité minimum (en μ g)	Couleur	Quantité minimum (en μ g)
Benzidine	0,02	orange	0,1	bleu	0,1
Diphényline	0,18	jaune	0,5	bleu-violet	1
O.-amino benzidine ..	0,57	jaune	1	rouge-violet	0,5
Amino-2 diphénylamine	0,74	jaune-ocre	3	rose-violet	2
Amino-4 diphénylamine	0,33	rouge	1	violet	1
Hydrazobenzène	0,86	orange		bleu	

2. TECHNIQUE DE CHWATT ET ADER

— *Principe* : La chromatographie s'effectue sur papier Whatman n° 1. Le solvant utilisé est l'éther de pétrole saturé d'eau. L'identification des différentes amines se fait en plongeant le chromatogramme successivement dans une solution à 5 p. 100 de chloramine T, puis dans une solution à 10 p. 100 d'acide acétique.

Application de la méthode à l'urine

Une quantité déterminée d'urine, alcalinisée par quelques gouttes d'hydroxyde de sodium 6N, est extraite par un volume d'éther correspondant au volume de l'urine $\times 17$. Après lavage par l'eau distillée, l'extrait éthéré est séché sur chlorure de calcium, puis concentré à un volume de 0,5 ml avant d'être chromatographié. Les résultats obtenus par les auteurs sont consignés dans le *tableau IV* ci-dessous :

TABLEAU IV
(d'après CHWATT et ADER)

SUBSTANCE	Rf	COULEUR	QUANTITÉ MINIMUM (en μg)
Benzidine	0,09	Jaune orange	0,5
Dianisidine	0,28	amarante	0,5
O. Tolidine	0,31	jaune	0,5
Dichlorobenzidine	0,74	jaune	1

CHWATT ajoute que les meilleurs résultats sont obtenus pour des concentrations inférieures, ou égales à 5 μg . Des concentrations plus élevées donnent des spots mal formés, et, en particulier, l'o. tolidine et la dianisidine sont mal séparées.

RAPPEL ET EXAMEN CRITIQUE DES MÉTHODES EXPOSÉES

Nous venons d'exposer, en développant les éléments qui nous ont semblé essentiels, les principales méthodes appliquées à la caractérisation, à la séparation et au dosage de la benzidine dans les milieux complexes, tant industriels que biologiques.

Il nous paraît utile, en adoptant une autre classification, de rappeler les objectifs pour lesquels telle ou telle méthode semble plus spécifiquement indiquée :

- 1° Lorsqu'il s'agit du dosage dans les atmosphères, les vêtements de travail, les dépôts industriels ou les urines d'ouvriers, la méthode à la *chloramine T* (GLASSMAN et coll., GAGE, BUTT et STRAFFORD), la méthode à l'acide hydroxynaphtoïque (BUTT et STRAFFORD) et les méthodes chromatographiques de BUTT et STRAFFORD, de GASPARIC et coll. ou de CHWATT et ADER, paraissent comme les plus aisées et les plus rapides.
- 2° Lorsqu'il s'agit de doser la benzidine, surtout du point de vue expérimental, dans les milieux biologiques, la méthode de BAKER basée sur la diazotation suivie de copulation avec le naphthol-2 disulfonate de sodium, et celle d'ENGELBERTZ et BABEL basée sur la formation d'un complexe coloré avec le sel de sodium de l'acide naphtoquinone-sulfonique semblent les plus indiquées.

* *

En conclusion de ce chapitre, nous devons reconnaître que le nombre et la diversité des méthodes préconisées, ainsi que les nombreuses variantes apportées aux techniques primitivement établies, indiquent que le dosage de la benzidine, en hygiène industrielle ou en biologie, est un problème difficile à résoudre. En effet, la communauté des réactions chimiques et analytiques de cette diamine avec, d'une part, les autres amines industrielles, dont le nombre est important, et, d'autre part, certains constituants des tissus ou certains produits normaux du métabolisme, ainsi que la complexité des milieux à partir desquels il faut l'extraire sont autant de causes qui nuisent à l'élaboration d'une méthode de dosage, sûre et vraiment spécifique.

CHAPITRE SECOND

ÉTABLISSEMENT D'UNE MÉTHODE PERSONNELLE DE DOSAGE DE LA BENZIDINE

Nous signalerons tout de suite qu'à côté de la méthode chimique de dosage de la benzidine dont l'exposé fait l'objet de ce second chapitre, nous avons mis au point une technique chromatographique qui nous a particulièrement servi à rechercher et à identifier les métabolites de la benzidine dans les urines ou les tissus ; aussi avons-nous jugé préférable de ne pas dissocier cette technique de l'étude expérimentale du métabolisme et nous l'exposerons donc dans la cinquième partie de notre travail (p. 119 à p. 142).

Dans ce second chapitre, nous indiquerons d'abord brièvement les essais préliminaires que nous avons effectués, et qui ne nous ont pas donné satisfaction, avant d'examiner en détail la méthode inspirée de celle préconisée par MARSHALL [116] pour le dosage des sulfamides que nous avons finalement adoptée pour le dosage de la benzidine. Nous étudierons alors successivement le principe, les réactifs, les procédés de captation dans les atmosphères et d'extraction des milieux biologiques, enfin la technique de dosage proprement dite dont nous discuterons ensuite les limites d'application en rapport avec la sensibilité et la spécificité.

I. — ESSAIS PRÉLIMINAIRES

Au cours de ces essais, nous avons tenté, d'une part, d'adapter sur le plan analytique et toxicologique la réaction de formation de *Rouge Congo* à partir de la benzidine, d'autre part, d'inverser une des variantes de la *réaction de Koenig* utilisant la benzidine comme arylamine.

A) FORMATION DE « ROUGE CONGO »

La benzidine est diazotée par le nitrite de sodium en milieu acétique et le diazoïque obtenu est copulé avec le sel de sodium de l'acide naphthionique (acide α -naphtylamine-sulfonique-4) en présence d'acétate de sodium, au bain-marie.

Nous avons opéré avec des doses de benzidine comprises entre 10 μ g et 60 μ g. Nous avons ainsi obtenu une *coloration rose orangé* assez intense, mais malheureusement peu stable. De plus, cette technique n'a pas toujours donné, dans ses conditions apparemment identiques, des résultats constants.

B) REACTION DE KOENIG « INVERSEE »

Une solution acétonique de benzidine est versée dans une solution à 1 p. 1.000 de pyridine traitée au préalable par 2 ml d'une solution de bromure de cyanogène préparée extemporanément. Il se produit une *coloration jaune*. Cette réaction est très sensible, puisque nous l'avons réalisée avec des doses de benzidine allant de 1 μ g à 10 μ g, mais, comme la précédente, elle ne fournit pas toujours des résultats comparables pour les mêmes quantités d'amine. Il en est de même si l'on remplace la pyridine par la nicotine selon la technique établie par FABRE, TRUHAUT et BOUDÈNE [64] pour le dosage de petites quantités de cet alcaloïde dans les atmosphères.

Devant ces échecs, nous avons songé à essayer la réaction utilisée par MARSHALL pour le dosage des sulfamides dans le sang et dans l'urine [116] : il s'agit d'une réaction de diazotation suivie d'une copulation avec la diméthyl- α -naphtylamine qui donne une coloration rouge pourpre. TRÉFOUEL [162] a proposé l'emploi, comme agent copulant, du chlorhydrate de l' α -naphtyldiéthyl-propylène-diamine, plus facile à préparer ; dans ce cas, la coloration obtenue est violet sombre.

Nous avons pu adapter cette réaction au dosage de la benzidine dans les milieux complexes suivant la méthode que nous allons décrire.

II. — MÉTHODE DE DOSAGE DE LA BENZIDINE

A) PRINCIPE

En présence de méthyléthylcétone (ou butanone), la copulation, en milieu acide, du sel de bis-diazonium de la benzidine avec le chlorhydrate de N- α -naphtyl-diéthyl-propylène-diamine donne une colora-

tion bleue, stable, se prêtant facilement à un dosage spectrophotométrique.

Cette méthode s'applique aux *atmosphères*, après captation de l'amine par barbotage de l'air dans la butanone, et aux *milieux biologiques* après extraction de la benzidine par le même solvant, soit par extraction continue des humeurs ou des urines dans un appareil convenable, soit par épuisement des organes préalablement broyés en présence de sable.

B) REACTIFS UTILISES

- 1) *Méthyl-éthyl-cétone* ou butanone purifiée par distillation (Eb : 79,6°).
- 2) *Acide chlorhydrique pur* (D_{20} : 1,17) : solution à 1 p. 10, en volume, dans l'eau distillée.
- 3) *Nitrite de sodium pur* : solution à 0,1 g p. 100 dans l'eau distillée (conservation assurée pendant 3 jours).
- 4) *Sulfamate d'ammonium* : solution à 0,5 g p. 100 dans l'eau distillée (conservation indéfinie).
- 5) *Chlorhydrate de N- α -naphtyl-diéthyl-propylène-diamine* : solution à 0,1 g p. 100 dans l'eau distillée (conservation assurée pendant 6 jours en flacon jaune).

C) PROCÉDES D'EXTRACTION

1. DANS LES ATMOSPHÈRES

L'air, contenant des *poussières de benzidine* est aspiré, à l'aide d'une trompe à vide, à travers deux barboteurs à pointes de Vigreux, mis en série, contenant chacun 8 ml de butanone et maintenus dans la glace fondante. La vitesse de passage doit être d'environ 4 à 5 litres par minute. On a intérêt, pour gagner en précision, à faire passer un grand volume d'air ; en général, un barbotage d'une heure, correspondant à environ 300 litres, suffit. A la fin de l'opération, on transvase la butanone de chacun des barboteurs dans deux tubes bouchés à l'émeri et jaugés à 10 ml. On complète à ce dernier volume par la quantité suffisante de butanone avec laquelle on aura lavé les barboteurs au préalable. On dose la benzidine dans chacun des tubes.

2. DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES

a) *Sang* :

Chez l'Animal, 5 ml de sang prélevés sur anti-coagulant, sont ajoutés, goutte à goutte et en agitant, à 20 ml de butanone contenue dans un verre à pied. On utilise une pipette à écoulement total, et,

à la fin de l'opération, on rince la pipette avec le minimum d'eau qui est jointe à la butanone. On continue alors à agiter soigneusement pendant quelques minutes et on laisse au repos ; la butanone surnageante est décantée et mise de côté. Le coagulum restant au fond du verre est alors trituré avec quelques gouttes de lessive de soude et épuisé de nouveau (pour extraire les dérivés conjugués), à deux reprises, par 10 ml de butanone qui sont joints aux 20 premiers centimètres cubes. On a donc au total 40 ml de butanone environ, qui sont concentrés sous vide à un volume de 20 ml. On dose alors la benzidine libre sur une première fraction de 10 ml et la benzidine conjuguée, sur la seconde fraction après hydrolyse. Pour l'*hydrolyse*, il suffit de porter au bain-marie à une température voisine de 80° et pendant deux heures, un tube bouché à l'émeri contenant 10 ml de butanone d'extraction et 3 ml d'acide chlorhydrique au 1/10. On pratique la réaction colorée directement dans ce tube.

b) Urine :

On effectue le dosage sur de l'urine fraîchement recueillie ou conservée, pendant un temps suffisamment court, au réfrigérateur. Cette urine est filtrée et centrifugée, surtout s'il s'agit d'urines d'herbivores (Lapin en particulier) riches en phosphates minéraux susceptibles de gêner la réaction colorée. De toutes façons, on a intérêt à opérer l'extraction sur un liquide parfaitement limpide. Une quantité exactement mesurée (50 ml pour l'urine humaine) est alcalinisée par quelques gouttes de lessive de soude jusqu'à un pH compris entre 8,5 et 9 et extraite par deux fois son volume de butanone dans une ampoule à décantation. On agite soigneusement en évitant de provoquer une émulsion, bien que ce risque, avec la butanone, soit moins grand qu'avec l'éther. Toutefois, si l'émulsion se produit, surtout avec des urines de Cobaye ou de Lapin, on peut facilement la détruire par addition de quelques centimètres cubes d'alcool à 90° C. Après une agitation d'environ 10 minutes, on laisse reposer ; la phase aqueuse soutirée est de nouveau alcalinisée jusqu'à un pH supérieur à 10 et extraite à deux reprises par son volume de butanone. Les phases solvantes réunies sont concentrées sous vide à un volume de 10 ml sur lequel on effectue la réaction colorée pour doser la benzidine libre. Pour la benzidine conjuguée, on porte au B.M., à une température voisine de 80° pendant deux heures, une quantité connue d'urine avec son égal volume d'acide chlorhydrique au 1/10. Après refroidissement, l'urine est alcalinisée et extraite comme précédemment.

c) Organes :

Les organes, ou fragments d'organes des différentes espèces animales (Rat, Lapin, Cobaye), sont, dès leur prélèvement, broyés au

mortier de verre en présence de sable lavé. Lorsque l'organe est réduit à l'état de pulpe, on l'extrait par un volume de butanone égal à dix fois son poids (1 g = 1 ml). Après un temps de contact de quinze minutes, pendant lequel on agite de temps en temps, la butanone est décantée et filtrée. La pulpe mêlée de sable est alors, comme pour le sang, triturée avec quelques gouttes de lessive de soude, puis extraite de nouveau, à deux reprises par cinq fois son volume de solvant. Les phases solvantes sont alors concentrées sous vide à un volume déterminé, dont 10 ml servent à doser la benzidine libre ; 10 autres sont hydrolysés, comme pour le sang, pour doser la benzidine conjuguée.

D) DOSAGE COLORIMETRIQUE

1. DÉVELOPPEMENT DE LA RÉACTION COLORÉE

- a) Aux 10 ml de butanone, non soumis à l'hydrolyse, sont ajoutés 3 ml d'acide chlorhydrique au 1/10 (R.2). Après agitation, on laisse reposer pendant quelques minutes. La couche aqueuse chlorhydrique se sépare au fond du tube.
- b) On provoque la diazotation en ajoutant 1 ml de la solution de nitrite de sodium (R.3) en opérant à basse température.
- c) Après cinq minutes, l'excès d'acide nitreux est détruit en ajoutant 1 ml de solution de sulfamate d'ammonium (R.4) et en abandonnant cinq minutes après agitation.
- d) Enfin, on ajoute 1 ml de la solution de N- α -naphthyl-diéthyl-propylène-diamine (R.5) et on agite.

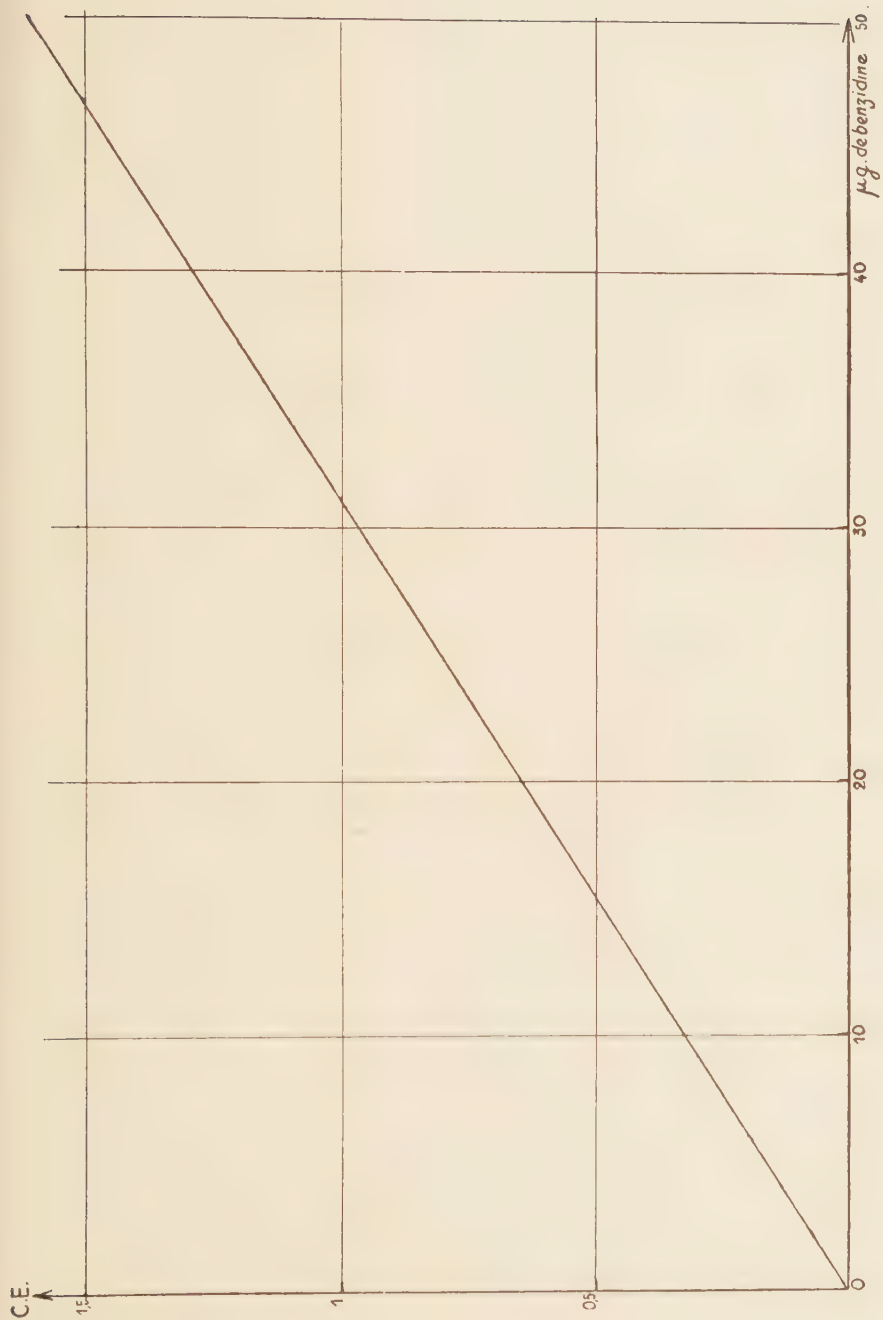
Il se développe peu à peu dans la phase aqueuse une coloration violette qui vire rapidement au bleu et se stabilise au bout d'une heure. Il suffit alors de compléter avec précaution le volume de cette phase aqueuse colorée jusqu'au trait de jauge de 10 ml par de l'eau distillée.

2. MESURE DE LA COLORATION DÉVELOPPÉE

Nous effectuons personnellement cette mesure à l'aide d'un spectrophotomètre de Pulfrich en utilisant une cuve de 1 cm et l'écran n° 5 (570 m μ). Du coefficient d'extinction obtenu, est déduite la concentration en benzidine dans les 10 ml de butanone prélevés, en se référant à une courbe d'étalonnage (courbe n° 1).

3. ÉTABLISSEMENT DE LA COURBE D'ÉTALONNAGE

La courbe d'étalonnage est établie en utilisant une solution récente de benzidine base dans la butanone. Cette solution est diluée de façon



COURBE N° 1 : Courbe d'étalonnage

(Photomètre de Pulfrich — Ecran n° 5 — Cuve 1 cm)

à obtenir, dans chacun des tubes, des concentrations correspondant à 5 μg , 10 μg , 20 μg , 30 μg , etc. d'amine.

La benzidine utilisée est purifiée par sublimation sous pression réduite (P.F. : 128°).

On provoque la réaction colorée selon la technique indiquée plus haut.

La courbe n° 1 montre qu'on a intérêt, pour la lecture au photomètre, à opérer sur des prises d'essai comprises entre 2 et 40 μg .

E) DISCUSSION DE LA METHODE

Les *procédés d'extraction et d'hydrolyse* de la benzidine sont relativement faciles à mettre en œuvre et n'exigent qu'un matériel très simple.

A partir d'essais témoins réalisés en ajoutant des quantités connues de benzidine base ou de son dérivé diacétylé à différents milieux biologiques (foie, cerveau, reins, urines, sang), l'application de ces procédés nous a permis de retrouver :

a) *Pour les urines :*

- 90 à 95 p. 100 de la benzidine base ajoutée ;
- 82 à 86 p. 100 de la base correspondant au dérivé diacétylé ajouté.

b) *Pour les organes et le sang :*

- 85 à 89 p. 100 de la benzidine ajoutée ;
- 76 à 80 p. 100 de la base correspondant au dérivé diacétylé ajouté.

La réalisation de la *réaction colorée* ne nécessite que des réactifs et du matériel couramment utilisés dans les laboratoires de chimie biologique. Elle ne demande, d'autre part, aucune précaution particulière, si ce n'est celle de provoquer la diazotation à une température inférieure à 10°. Quant à la coloration bleue obtenue, elle présente les avantages d'être parfaitement stable au bout d'une heure et de se conserver longtemps.

Cette coloration bleue n'apparaît qu'en présence d'une *cétone*. Nous avons adopté la méthyl-éthyl-cétone ou *butanone*, car, dans les conditions où nous opérons, seule une faible partie du solvant est dissoute dans la phase chlorhydrique, alors que la plus grande partie surnage ; cette dernière phase, maintenant ainsi, hors du milieu réactionnel, des produits (graisses, pigments) susceptibles de gêner le développement ou de fausser la lecture de la réaction colorée.

Malheureusement, la spécificité de notre méthode n'est pas absolument rigoureuse, comme le montre le *tableau V* qui permet en outre de comparer la méthode que nous avons mise au point avec celle faisant appel à la chloramine T. Parallèlement à la benzidine, la dianisidine donne, aussi, une coloration bleue, mais la réaction est peu sensible.

TABLEAU V
CARACTÉRISATION ET DOSAGE COLORIMÉTRIQUE
DE LA BENZIDINE (INTERFÉRENCES)

PRODUIT ESSAYÉ (20 μ g)	MÉTHODE A LA CHLORAMINE T (coloration de la phase chloroformique)	MÉTHODE PERSONNELLE AZOÏQUE/BUTANONE (coloration de la phase aqueuse)
Benzidine	Jaune	Bleu
α -Naphthylamine	0	} Violet (faible)
β -Naphthylamine	0	
Aniline	0	
Diphénylamine	0	0
O. Tolidine	Jaune	Violet
Dichlorobenzidine	0	0
Dianisidine	Jaune (faible)	Bleu (faible)
Hydrazobenzène	0	0
Dihydroxy-3, 3' benzidine.	Jaune	Mauve
Phénol	Jaune (très faible)	0
O. Crésol	0	0

Dans les milieux biologiques, les colorations parasites sont longues à apparaître et le plus souvent négligeables. Chez l'Homme, les interférences dues à la présence de dérivés sulfamidés dans les urines sont à envisager, mais il ne s'agit là que d'incidents dus à des traitements occasionnels et de courte durée, dont le médecin a d'ailleurs connaissance.

Le *dérivé diacétylé* de la benzidine ne donne évidemment aucune coloration ; en revanche, le *dérivé monoacétylé* est à l'origine, comme

les naphtylamines, d'une coloration violette mais qui n'apparaît qu'à des concentrations supérieures à 30 μg , dans les conditions de la réaction. Néanmoins, et compte tenu que certains métabolites de la benzidine, de structure jusque-là inconnue, peuvent contenir dans leur molécule un et même deux groupements NH_2 et participer aussi au développement de la réaction colorée, les résultats que nous présentons dans notre travail correspondent aux *substances diazotables* (libres ou combinées) contenues dans le matériel biologique examiné. Pour la commodité d'interprétation et en fonction de notre courbe d'étalonnage, nous avons exprimé ces substances diazotables en *benzidine libre* et en *benzidine conjuguée*. Les techniques chromatographiques nous permettront de préciser, du moins en partie, la nature de ces produits de transformation.

Cette méthode de dosage de la benzidine permet de mettre en évidence :

- 10 μg de benzidine par m^3 d'air ;
 - 50 μg « par litre d'urine ;
 - 50 μg « pour 100 ml de sang ;
 - 1 μg « par g d'organe frais.
-

**Recherches personnelles
sur la répartition de la Benzidine
dans l'organisme animal
au cours de l'intoxication expérimentale**

* Après avoir établi une méthode de dosage de la benzidine dans les milieux biologiques, nous l'avons appliquée à l'étude de la répartition du produit au cours des intoxications expérimentales réalisées chez différentes espèces animales, dans des conditions variées.

En raison de la faible utilisation de la benzidine en France et des mesures de sécurité déjà scrupuleusement observées, nous n'avons pu joindre aux résultats de notre expérimentation animale, que des observations très limitées concernant des sujets humains exposés. Nous devons seulement signaler à ce propos que nous n'avons pas pu mettre en évidence la moindre trace de l'amine aromatique, non plus que des produits de son métabolisme dans 12 échantillons d'urines d'ouvriers manipulant la benzidine à l'usine de Brignoux (Isère) des Etablissements KUHLMANN.

Nous tenons à ce propos à remercier spécialement le Docteur MAZET (†), Médecin du Travail de ces Etablissements, aujourd'hui disparu, qui a bien voulu récolter ces échantillons et nous les faire parvenir.

Dans un premier chapitre, nous étudierons la répartition de la benzidine, à la suite d'intoxications aiguë, subaiguë et chronique, dans les principaux organes du RAT, du LAPIN et du COBAYE.

A la suite de cette étude, nous serons amenés, dans un second chapitre, à pousser plus loin notre investigation et à essayer de déterminer, grâce à une méthode de « centrifugation différentielle », la répartition de la benzidine au niveau des structures isolées de la cellule hépatique du RAT : noyau, mitochondries, microsomes et cytoplasme.

L'étude de l'élimination urinaire de la benzidine aurait pu trouver sa place ici, mais nous avons jugé préférable de la présenter dans notre cinquième partie réservée aux recherches sur le métabolisme.

CHAPITRE PREMIER

RÉPARTITION DE LA BENZIDINE DANS L'ORGANISME

Comme nous l'avons indiqué, nous avons utilisé pour l'étude de la répartition de la benzidine le RAT, le LAPIN et le COBAYE. Nous étudierons successivement, en commentant les résultats obtenus, l'intoxication aiguë et subaiguë, par voie intrapéritonéale, chez le RAT, le LAPIN et le COBAYE, puis l'intoxication chronique par la voie cutanée chez le LAPIN et par la voie orale chez le RAT. Dans tous les cas, nous avons opéré en présence de lots d'animaux témoins.

I. — INTOXICATION AIGUE

Ce mode d'intoxication a été réalisé chez le RAT et le LAPIN.

A) CHEZ LE RAT

Quatre rats adultes, de race « Wistar », d'un poids moyen de 230 g, ont reçu en injection intrapéritonéale 150 mg/kg de benzidine base dans le propylène glycol. Parallèlement, quatre rats de même race et de poids voisin ont reçu chacun 2 ml de propylène glycol pur. Ces derniers animaux n'ont manifesté aucun signe d'intolérance, alors que les quatre rats traités à la benzidine sont morts dans les trois heures qui ont suivi l'injection, après avoir accusé des symptômes caractéristiques, en particulier paralysie motrice des membres postérieurs avec tendance très nette à la perte de l'équilibre, balancement de la tête, respiration saccadée, polypnée et signes d'asphyxie. Malgré une très forte consommation d'eau, aucune élimination urinaire n'a été enregistrée durant ces trois heures. L'autopsie et le prélèvement des

organes ont eu lieu immédiatement après la mort. Les organes, pesés et épongés sur papier filtre, ont été découpés en fins morceaux puis mélangés, et une partie aliquote correspondant à un prélèvement moyen a été extraite par la méthyl-éthyl-cétone selon la technique décrite précédemment.

Les résultats obtenus, exprimés en microgrammes de benzidine base par gramme d'organe frais, sont ressemblés dans le *tableau VI*.

TABLEAU VI
RÉPARTITION DE LA BENZIDINE LIBRE ET CONJUGUÉE
DANS LES PRINCIPAUX ORGANES DU RAT AU COURS DE L'INTOXICATION AIGUE
(4 animaux ayant reçu 150 mg/kg de benzidine base dans le propylène-glycol en injection intra-péritonéale : morts dans les 3 heures suivant l'injection; pas d'émission d'urines)

ORGANES	POIDS D'ORGANE EXTRAIT PAR LA BUTANONE (en g)	QUANTITÉS DE BENZIDINE PAR GRAMME D'ORGANE FRAIS (en µg)		
		Libre	Libre et conjuguée	Conjuguée
FOIE	10	53	75	22
REIN	4	39	75,5	36,5
POUMON	3,35	7,8	53,7	45,9
CŒUR	2,25	6,7	28,5	21,8
RATE	2	15	67,7	52,7
CENTRES NERVEUX				
— Cerveau	2,65	27,2	liquides très troubles	
— Cervelet				
— Partie de moelle				
VESSIE	0,30	traces	43,3	
SURRÉNALES	0,26	0,6	50	49,4
APPAREIL DIGESTIF ET CONTENU	7,85	30	73,2	43,2

B) CHEZ LE LAPIN

L'intoxication aiguë chez le Lapin a été réalisée en injectant par voie intrapéritonéale chez deux animaux, d'un poids voisin de 3 kg, 100 mg/kg de benzidine dans le propylène glycol. Les deux animaux sont morts dans un délai de 2 heures après l'injection, alors qu'un animal injecté au propylène glycol, dans les mêmes conditions, s'est comporté normalement.

Le tableau VII rassemble les chiffres obtenus dans différents organes, les dosages ayant été limités à la benzidine libre.

TABLEAU VII
RÉPARTITION DE LA BENZIDINE LIBRE
DANS LES PRINCIPAUX ORGANES DU LAPIN
AU COURS DE L'INTOXICATION AIGUE

(2 animaux morts dans un délai de 2 heures après injection d'une solution de benzidine dans le propylène-glycol, à la dose de 100 mg/kg)

ORGANES	POIDS D'ORGANE EXTRAIT PAR LA BUTANONE (en g)	QUANTITÉ DE BENZIDINE LIBRE PAR GRAMME D'ORGANE FRAIS (en μ g)
FOIE	22	30
REIN	17	9
POUMON	15	4
CŒUR	19	0.85
RATE	1,10	2.5
CENTRE NERVEUX SUPÉ- RIEURS	10,15	1.5
VESSIE	3,25	3.65
MOELLE ÉPINIÈRE	2.65	0.3
SURRÉNALES	0,25	traces

La lecture de ces deux tableaux met en évidence un certain nombre de faits :

1) Les organes où l'on retrouve le plus de benzidine, sont, comme il est d'ailleurs classique avec la plupart des toxiques, le foie et le rein.

La localisation hépatique est intéressante à souligner, puisque, d'une part, c'est au niveau du foie que selon toute vraisemblance se produit, comme nous le confirmerons d'ailleurs plus tard, le blocage par conjugaison des groupes NH_2 du toxique et que, d'autre part, ainsi que nous l'avons déjà mentionné, des cancers du foie ont pu être décelés chez le Rat par SPITZ, MAGUIGAN et DOBRINER [159].

Quant à la *localisation rénale*, elle est à mettre en parallèle avec les néphrites hématuriques constatées chez l'Homme par certains auteurs, GOLDBLATT [76], en particulier.

Il faut noter, par ailleurs, dans le *tableau VI*, que le rapport

$$\frac{\text{benzidine libre}}{\text{benzidine libre} + \text{conjuguée}}$$

est plus élevé dans le foie que dans le rein, ce qui confirme, du moins chez le Rat, une tendance à l'élimination de formes conjuguées.

2) La localisation au niveau des *centres nerveux* supérieurs, spécialement chez le Rat, qui s'explique au moins partiellement par la richesse de ces organes en lipides, n'est pas non plus sans intérêt; elle permet d'expliquer les troubles de l'équilibre que nous avons remarqués. Ces symptômes peuvent peut-être résulter, au moins en partie, d'une action méthémoglobinisante de la benzidine, à laquelle, comme on sait, les tissus nerveux avides d'oxygène sont particulièrement sensibles.

En effet, comme nous le verrons dans la quatrième partie de notre travail, chez le Rat intoxiqué dans les mêmes conditions, nous avons pu mettre en évidence la présence de méthémoglobine.

3) La répartition des formes libres et conjuguées dans l'*épithélium vésical* est particulièrement importante à considérer, puisque c'est électivement au niveau de cet organe que se manifestent les effets cancérogènes de l'amine. La présence pratiquement exclusive de formes conjuguées vient à l'appui de l'hypothèse selon laquelle les formes actives seraient des produits de transformation métabolique de la benzidine.

4) Les quantités importantes de toxique que nous retrouvons dans l'*appareil digestif* sont sans doute dues à l'élimination de la benzidine par l'intermédiaire de la bile. Nous reviendrons sur ce point en exposant les résultats que nous avons pu obtenir par la technique chromatographique. Cette forte concentration au niveau du tube digestif a d'ailleurs été mise en évidence par BAKER et DEIGHTON [11] chez le Rat, à la suite d'une seule injection de benzidine à raison de 100 mg/kg, par voie intrapéritonéale.

5) Il y a enfin lieu de souligner la proportion élevée de benzidine conjuguée dans les *surrénales*. Cette localisation est sans doute en rapport, d'une part avec la richesse en lipides de la glande, d'autre part, avec son activité métabolique considérable.

II. — INTOXICATION SUBAIGUE

Elle a été réalisée chez le RAT, le LAPIN et le COBAYE.

A) CHEZ LE RAT

Nous avons effectué deux séries d'expériences.

— D'une part, dans la série I, 4 rats adultes, de race « Wistar », ont reçu, au cours d'une seule injection intrapéritonéale, 100 mg/kg de benzidine base dans le propylène glycol. Ils ont été sacrifiés au bout de 8 heures ainsi que 2 rats témoins n'ayant reçu que du propylène glycol.

— D'autre part, dans la série II, 4 rats de même origine que les précédents, ont reçu pendant 4 jours, à raison d'une injection par jour, 30 mg/kg de benzidine, toujours dans le propylène glycol. Deux animaux sont morts après la quatrième injection ; les 2 autres ont été sacrifiés.

La répartition de la benzidine dans les principaux organes est consignée dans les *tableaux VIII et IX*.

Lorsqu'on examine ces deux tableaux, plusieurs faits paraissent intéressants.

1) Ainsi qu'il ressort en particulier du *tableau VIII*, on ne retrouve pas de benzidine libre et conjuguée dans un certain nombre d'organes, en particulier la vessie.

2) Les quantités de benzidine présentes dans le tube digestif, aussi bien sous forme libre que sous forme conjuguée, sont considérables. Etant donnée la voie d'introduction du toxique (injection intrapéritonéale), ces faits semblent confirmer une intervention importante de l'excrétion biliaire ainsi que nous l'avons déjà signalé plus haut, au cours de l'intoxication aiguë. La benzidine serait donc un nouvel exemple de toxique s'éliminant par la bile.

3) La lecture des chiffres du *tableau IX* nous montre que par administration, non plus passagère mais répétée, de benzidine, se manifeste une accumulation de l'amine aromatique dans tous les organes, particulièrement dans le foie, les reins et la rate ; on retrouve alors le produit sous les formes libre et conjuguée, sauf dans les surrénales où il existe en totalité sous forme libre, ce qu'il ne nous a pas été possible d'interpréter jusqu'ici.

TABLEAU VIII

RÉPARTITION DE LA BENZIDINE LIBRE ET CONJUGUÉE
DANS LES PRINCIPAUX ORGANES DU RAT AU COURS DE L'INTOXICATION SUBAIGUE
(Série I)

(4 animaux ayant reçu 100 mg/kg de benzidine base dans le propylène-glycol en injection intra-péritonéale et sacrifiés au bout de 8 heures)

ORGANES	POIDS D'ORGANE EXTRAIT PAR LA BUTANONE (en g)	QUANTITÉS DE BENZIDINE PAR GRAMME D'ORGANE FRAIS (en μ g)		
		Libre	Libre et conjuguée	Conjuguée
FOIE	10	3,4	41	37,6
POUMON	2,15	0	12,5	12,5
CŒUR	1,50	0	12	12
RATE	1,35	0	7	7
CERVEAU	3,30	1,2	5,1	3,9
MOELLE	0,25	0	0	—
VESSIE	0,30	0	0	—
INTESTIN ET CONTENU	5	67,5	243	175,5
ESTOMAC ET CONTENU	6,9	160	223	163

TABLEAU IX

RÉPARTITION DE LA BENZIDINE LIBRE ET CONJUGUÉE
DANS LES PRINCIPAUX ORGANES DU RAT AU COURS DE L'INTOXICATION SUBAIGUE
(Série II)

(4 animaux ayant reçu, chaque jour, pendant 4 jours, 30 mg/kg de benzidine dans le propylène-glycol en injection intrapéritonéale)

ORGANES	POIDS D'ORGANE EXTRAIT PAR LA BUTANONE (en g)	QUANTITÉS DE BENZIDINE PAR GRAMME D'ORGANE FRAIS (en μ g)		
		Libre	Libre et conjuguée	Conjuguée
FOIE	7,75	20	38,7	18,7
REIN	1,85	16,2	22,5	6,3
POUMON	2	4,5	15	10,5
CŒUR	1,70	7	12	5
RATE	0,60	22,5	67,5	45
CERVEAU	1,20	10	17	7
CERVELET	0,30	13	14	1
SURRÉNALES	0,15	30	30	—
THYROÏDE	0,05	—	traces	traces
VESSIE	0,30	traces	traces	traces

B) CHEZ LE LAPIN

Deux lapins de 3 kg reçoivent chaque jour, pendant 7 jours, 50 mg/kg de benzidine en injection intrapéritonéale dans le propylène glycol. La dose totale de benzidine ainsi administrée est voisine de 1 g. Les animaux sont sacrifiés le huitième jour. Les résultats obtenus sont consignés dans le *tableau X*.

La lecture de ce tableau appelle peu de commentaires ; on remarquera pourtant que les formes conjuguées sont en assez faible proportion par rapport aux formes libres et que, comme nous l'avons déjà constaté chez le Rat, la concentration de benzidine libre, au niveau du rein, est supérieure à celle au niveau du foie ; par contre, à l'inverse de ce que nous avons vu chez le Rat, le toxique n'est retrouvé qu'à l'état de traces dans les capsules surrénales.

C) CHEZ LE COBAYE

Deux cobayes femelles d'un poids de 600 g reçoivent, à 24 heures d'intervalle, 2 injections de benzidine dans le propylène-glycol correspondant à un total de 50 mg. Les animaux meurent respectivement 18 heures et 24 heures après la seconde injection. Le *tableau XI* rapporte la répartition de l'amine dans les différents organes.

L'examen de ce tableau met en évidence, à côté d'une nette fixation hépatique et rénale, l'absence presque totale de benzidine libre dans des organes comme le cœur ou la rate, qui, en revanche, renferment en quantités relativement importantes la benzidine sous forme conjuguée. D'ailleurs on peut remarquer que, dans la plupart des organes, les quantités de benzidine conjuguée sont très supérieures à celles trouvées jusqu'ici chez les autres espèces animales. La présence de ces formes conjuguées, en quantités notables, est à rapprocher des constatations faite par RAY, GRyder et ARGUS [137], qui, comparant l'élimination des composés aminés cancérogènes, en particulier de l'amino-2.fluorène, chez le Rat et le Cobaye, ont conclu à une élimination beaucoup plus rapide du toxique chez ce dernier animal, sans doute en raison de la facilité qu'il a de pouvoir réaliser des formes « conjuguées » s'éliminant plus rapidement.

Enfin, comme chez le Rat, nous constatons une importante fixation surrénalienne.

TABLEAU X

RÉPARTITION DE LA BENZIDINE LIBRE ET CONJUGUÉE
DANS LES PRINCIPAUX ORGANES DU LAPIN AU COURS DE L'INTOXICATION SUBAIGUE
(2 lapins ayant reçu chacun 1 g de benzidine réparti en 7 injections pendant 7 jours).
Animaux sacrifiés

ORGANES	POIDS D'ORGANE EXTRAIT PAR LA BUTANONE (en g)	QUANTITÉS DE BENZIDINE PAR GRAMME D'ORGANE FRAIS (en µg)		
		Libre	Libre et conjuguée	Conjuguée
FOIE	7,30	18,5	25	6,5
REIN	11,85	32	44	12
POUMON	11,15	6	7,5	1,5
CŒUR	4,45	—	2	2
RATE	3,35	traces	2,5	2,5
CENTRES NERVEUX SUPÉ- RIEURS	5,75	traces	1,5	1,5
VESSIE	3,50	2	5	3
SURRÉNALES	0,30	traces	traces	traces
SANG	5 ml	4	13	9

TABLEAU XI

RÉPARTITION DE LA BENZIDINE LIBRE ET CONJUGUÉE
DANS LES PRINCIPAUX ORGANES DU COBAYE
AU COURS DE L'INTOXICATION SUBAIGUE

(2 cobayes ayant reçu chacun 50 mg de benzidine en 2 injections dans le propylène-glycol ;
morts au bout de 24 heures)

ORGANES	POIDS D'ORGANE EXTRAIT PAR LA BUTANONE (en g)	QUANTITÉS DE BENZIDINE PAR GRAMME D'ORGANE FRAIS (en µg)		
		Libre	Libre et conjuguée	Conjuguée
FOIE	5,35	23,5	93	69,5
REIN	3,90	7,7	17	9,3
POUMON	3	2,7	21,5	18,8
CŒUR	2,50	—	44	44
RATE	1,10	—	44	44
CERVEAU	2,60	—	9,2	9,2
CERVELET	0,60	—	10	10
VESSIE	0,90	3,8	71	67,2
OVAIRES	0,12	—	29	29
SURRÉNALES	0,41	15	25	10
SANG	5 ml	3,4	29	25,6
THYROÏDE	0,05	—	traces	traces

III. — INTOXICATION A LONG TERME, DITE CHRONIQUE

Pour se placer dans les conditions mêmes de travail des ouvriers dans l'industrie, l'intoxication chronique expérimentale devrait se prolonger pendant plusieurs années. Mais une telle expérimentation se révèle difficile : de plus, les conditions de contamination par voie pulmonaire semblent peu reproductibles.

En revanche, nous avons pu étudier la répartition du toxique à la suite de l'intoxication chronique par *voie cutanée* chez le Lapin et par *voie orale* chez le Rat.

A) CHEZ LE LAPIN

Deux lapins ont été, pendant six jours par semaine, quotidiennement badigeonnés sur la face interne de l'oreille avec une solution de benzidine base à 2 p. 100 dans l'acétate d'amyle pur.

Deux autres lapins ont servi de témoins et n'ont reçu, en badigeonnage, que de l'acétate d'amyle seul.

L'expérimentation a duré 4 mois. Au bout de ce temps, les animaux, qui d'ailleurs n'accusaient aucun signe d'intolérance, ont été sacrifiés par embolie gazeuse.

Nous n'avons pu retrouver le toxique que dans le foie et seulement en très faible quantité. Ce résultat a été confirmé par chromatographie d'extraits concentrés obtenus à partir du tissu hépatique.

B) CHEZ LE RAT

Quatre rats de race « Wistar » ont été soumis, pendant quarante jours, à un régime contenant 0,50 g de benzidine par kilo. Les animaux ont été sacrifiés au gaz de ville.

Si, dans le *tableau XII*, nous ne trouvons que peu de benzidine libre dans la plupart des organes, par contre, nous constatons la présence de formes conjuguées, en quantités appréciables, non seulement dans le foie et le rein, mais aussi, et c'est là un fait important, dans les capsules surrénales.

TABLEAU XII

RÉPARTITION DE LA BENZIDINE LIBRE ET CONJUGUÉE
DANS LES PRINCIPAUX ORGANES DU RAT AU COURS DE L'INTOXICATION CHRONIQUE
(4 animaux soumis pendant 40 jours à un régime contenant 0,50 g de benzidine base
par kg). Animaux sacrifiés

ORGANES	POIDS D'ORGANE EXTRAIT PAR LA BUTANONE (en g)	QUANTITÉS DE BENZIDINE PAR GRAMME D'ORGANE FRAIS (en µg)		
		Libre	Libre et conjuguée	Conjuguée
FOIE	7,10	0,50	69,8	69,3
CERVEAU ET CERVELET	1,90	traces	traces	traces
POUMON	2,70	0,50	5,5	5
CŒUR	0,50	traces	traces	traces
REIN	1,15	0,20	11,5	11,3
RATE	0,25	traces	traces	traces
SURRÉNALES	0,038	0,20	25	24,8
VESSIE	0,25	traces	traces	traces

En conclusion de ce chapitre, nous pouvons dire :

- 1° Qu'au cours des intoxications expérimentales aiguë, subaiguë et chronique, et chez toutes les espèces animales essayées (Rat, Lapin, Cobaye), la benzidine, s'éliminant soit sous *forme libre*, soit sous *forme conjuguée*, semble se localiser essentiellement au niveau du *foie* et du *rein*.
- 2° Que la fixation *surrénalienne* est importante chez le Rat et le Cobaye, pratiquement nulle chez le Lapin.
- 3° Que la vessie, organe le plus sensible chez l'Homme à l'action cancérigène de la benzidine, ne paraît, chez les espèces animales considérées, pas plus réceptive au toxique que les autres organes ; en particulier, au cours de l'intoxication chronique, par voies orale ou cutanée, la benzidine et ses formes d'élimination ne semblent pas se fixer électivement au niveau des parois vésicales.
- 4° Que les formes conjuguées prédominent nettement chez le Cobaye.

CHAPITRE SECOND

ESSAI DE RÉPARTITION DE LA BENZIDINE AU NIVEAU DES PRINCIPALES STRUCTURES DE LA CELLULE HÉPATIQUE

Dans le chapitre précédent, nous avons vu que la localisation hépatique de la benzidine était constante, quels que soient les modes d'intoxication utilisés. Nous avons voulu pousser plus loin notre investigation, en essayant de localiser la benzidine à l'intérieur même de la cellule hépatique, c'est-à-dire au niveau des principales structures : noyaux, mitochondries, microsomes et cytoplasme.

Il nous a semblé utile, avant de rapporter les résultats que nous avons obtenus, d'exposer la méthode qui nous a permis de réaliser la séparation de ces différentes structures.

I. — MÉTHODE D'ISOLEMENT DES STRUCTURES CELLULAIRES

A) PRINCIPE

L'isolement des principaux organites ou phases cellulaires a été effectué selon une méthode nouvelle, établie par CHAIVEAU, seul [37] ou en collaboration avec CLÉMENT [38], combinant, d'une part, la méthode introduite par CLAUDE [41] des « centrifugations différentielles », d'autre part, et c'est là son originalité, l'utilisation d'un milieu de dispersion de *densité élevée* qui permet une sédimentation sélective des particules.

En effet, le principe même de la méthode des « centrifugations différentielles », basé sur l'utilisation des différences de vitesse de

sédimentation entre particules, dans des milieux « dispersant » dont la concentration s'écarte en général peu de l'isotonie, ne permet pas une séparation totale, puisque toutes les particules se déplacent dans le même sens au cours de la centrifugation. Il faut alors multiplier les centrifugations pour obtenir un isolement satisfaisant.

Par contre, on peut obtenir une séparation totale si l'on utilise les différences de densité existant entre les particules et le milieu ; dans ces conditions, seules les particules dont la densité est supérieure à celle du milieu sédimentent ; les autres se déplacent en sens inverse.

Les milieux de dispersion employés par CHAUVÉAU et CLÉMENT sont constituées par des solutions très concentrées (0,88 M à 2,5 M) de saccharose. Ces solutions présentent en outre l'avantage de ne pas altérer la morphologie des structures cellulaires lorsque les préparations sont destinées à l'examen microscopique.

B) TECHNIQUE

Nous exposerons la technique que nous avons suivie au cours de notre expérimentation sur le foie de Rat intoxiqué par la benzidine.

L'animal est sacrifié par décapitation. Le foie est aussitôt recueilli et pesé (le foie d'un rat de 200 g pèse environ 8 g) ; 1 g d'organe est mis de côté pour doser, selon la technique indiquée dans la seconde partie de notre travail, la benzidine libre et la benzidine conjuguée.

La technique appliquée au reste de l'organe comporte deux temps : d'une part, isolement des noyaux, d'autre part, isolement des mitochondries des microsomes et du « hyaloplasme ».

1. ISOLEMENT DES NOYAUX

Trois grammes environ de foie, découpé en fins morceaux, sont homogénéisés dans un tube de POTTER [134] maintenu dans la glace fondante, dans 20 fois leur volume (60 ml) d'une solution de saccharose 2,2 M (soit à 75 p. 100). La suspension ainsi obtenue, de couleur rougeâtre, est répartie également dans 4 tubes à centrifuger d'une capacité de 20 ml et soumise pendant une heure à une centrifugation de 40.000 gravités (environ 22 à 23.000 tours/minute) dans une centrifugeuse réfrigérée à 0°.

On obtient, alors, au fond de chaque tube et adhérant aux parois, un petit culot rose (C_1) constitué par les *noyaux* et surmonté d'un liquide surnageant que l'on décante et que l'on met de côté pour l'analyse (S_1).

2. ISELEMENT DES MITOCHONDRIES, DES MICROSOMES ET DU « HYALOPLASME »

Une seconde prise d'essai de foie de l'ordre de 3 g est homogénéisée au tube de POTTER, comme pour les noyaux, mais avec 10 fois son poids en volume (30 ml) de solution de saccharose 0,88 M (soit à 30 p. 100), puis répartie et centrifugée pendant 30 minutes à 100 gravités (environ 1.850 tours/minute).

Cette première centrifugation a pour but d'éliminer les noyaux, les cellules conjonctives, les cellules sanguines et divers débris provenant de la membrane cellulaire. L'ensemble se sépare sous forme d'un culot (C_2) qui, après recueil du liquide surnageant (S_2), est de nouveau mis en suspension dans 30 ml de solution de saccharose à 30 p. 100 et soumis à une nouvelle centrifugation dans les mêmes conditions que la première. Ce lavage permet de récupérer les mitochondries entraînées avec le culot C_2 . Les liquides surnageant S_3 sont joints à S_2 (ce qui fait un total d'environ 60 ml) pour être traités en vue de la séparation des mitochondries et des microsomes.

a) *Mitochondries* :

S_2 et S_3 contenant mitochondries et microsomes, sont centrifugés pendant 20 minutes à 24.000 gravités (environ 17.000 tours/minute) : on obtient un culot *jaune ambré* de mitochondries souillées de microsomes et un liquide surnageant S_4 que l'on sépare. Le culot est remis en suspension dans 60 ml de saccharose 0,88 M et centrifugé de nouveau à 17.000 tours pendant 20 minutes afin de recueillir les microsomes retenus sur le culot de mitochondries. En définitive, on se trouve donc en présence d'un culot (C_3) de mitochondries pures et d'un liquide surnageant S_5 que l'on joint à S_4 (volume total d'environ 120 ml).

b) *Microsomes* :

Les 120 ml de solution de saccharose correspondant à $S_4 + S_5$ sont mis à centrifuger pendant 3 heures à 150.000 gravités (environ 40.000 tours/minute). Au bout de ce temps, on observe, au fond des tubes, un culot *rose translucide* (C_4) essentiellement composé par les microsomes, et surmonté d'un liquide (S_6) que l'on décante.

c) « *Hyaloplasme* » :

Sous ce nom, on désigne les fractions solubles (protéines, enzymes, sels minéraux, etc.) qui n'ont pas sédimenté au cours des centrifugations précédentes et se retrouvent ainsi dans la solution terminale S_6 .

Les centrifugeurs utilisés pour ces séparations sont l'« International Centrifuge », modèle refroidi et le centrifugeur « Servall »,

modèle SS2, tournant dans le vide. Les accélérations données sont calculées pour le fond des tubes. Nous rappelons enfin que toutes les manipulations sont effectuées à des températures voisines de 0 degré.

II. — RÉSULTATS DE NOTRE EXPÉRIMENTATION

A) PROTOCOLE D'EXPERIENCE

Après avoir effectué une première série d'essais sur un rat témoin non intoxiqué, ce qui nous a permis de vérifier que chacun des éléments isolés ne donnait aucune coloration parasite avec les réactifs utilisés dans notre méthode de dosage, nous avons opéré sur deux rats de race « Wistar », d'un poids moyen de 200 g, soumis à une intoxication subaiguë par la benzidine base et par le dichlorhydrate de benzidine :

— Le rat n° 1 a reçu, chaque jour, pendant 4 jours, 50 mg/kg de benzidine base dans le propylène-glycol en injection intrapéritonéale. La dernière injection a été pratiquée 6 heures avant la mort.

— Le rat n° 2 a reçu, dans les mêmes conditions que le précédent, 70 mg/kg de dichlorhydrate de benzidine (correspondant sensiblement à 50 mg/kg de benzidine base) dans du soluté physiologique, en injection sous-cutanée.

Au moment d'être sacrifiés, les deux animaux présentaient des signes très nets d'intoxication (état de torpeur, perte de l'équilibre, etc.).

B) RESULTATS

1. RAT N° 1 (intoxiqué par la benzidine base) :

a) *Les culots de noyaux* (C_1) ont été soumis pendant 10 minutes à l'action d'une solution d'acide chlorhydrique au 1/10 ; sur cette solution, nous avons pratiqué les réactions de diazotation, puis de copulation avec l' α .naphtyl-diéthyl-propylène-diamine en présence de butanone.

Nous n'avons pas retrouvé de benzidine libre, caractérisée par la coloration bleue de la phase aqueuse, mais nous avons noté l'apparition d'une *coloration violette*.

b) *Le liquide surnageant* (S_1) correspondant à la totalité des autres éléments cellulaires, a été épuisé par la butanone en milieu alcalin ; dans cet extrait, nous avons trouvé 29 μ g de benzidine libre pour une prise d'essai de 3,16 g de foie, soit environ 9 μ g par g d'organe.

c) Le foie total, pulvérisé au mortier en présence de sable, contenait 52 μ g de benzidine libre par gramme d'organe.

d) Les culots de *microsomes* et les *mitochondries* obtenus à partir d'une nouvelle prise d'essai de foie ont été étudiés en même temps que ceux du rat n° 2.

2. RAT N° 2 (intoxiqué par le dichlorhydrate de benzidine) :

a) Les culots de noyaux (C_1), correspondant à une prise d'essai de 3,05 g, ont été divisés en deux parties : la première partie a été traitée par 2 ml d'acide chlorhydrique au 1/10, la seconde par 2 ml de soude N, puis extraite par la butanone.

Dans les deux cas, nous n'avons pas pu mettre en évidence de benzidine libre. Mais il est apparu une coloration violette.

b) Nous avons retrouvé cette même coloration violette en effectuant la réaction colorée, en présence de butanone, sur les extraits chlorhydriques des culots de *mitochondries* des rats n° 1 et n° 2.

c) Quant aux extraits chlorhydriques des culots de *microsomes* des deux animaux, ils ont laissé apparaître une coloration bleue (plus intense chez le rat n° 1), indice de la présence de benzidine libre, mais que nous n'avons pu évaluer au photomètre en raison d'un trouble survenu dans le milieu.

Après *hydrolyse* des extraits de chacun des culots, nous n'avons constaté aucune modification des colorations obtenues précédemment.

Ces résultats ne laissent pas d'être très surprenants. D'une part, en effet, les quantités de benzidine trouvées dans le liquide surnageant du rat n° 1 sont nettement inférieures à celles retrouvées dans le foie total ; d'autre part, l'absence de benzidine libre dans les noyaux va à l'encontre de ce que nous attendions, car on pouvait penser, a priori, qu'au moins l'un des points d'attaque de l'amine cancérigène était le système nucléaire. Il ne faut toutefois pas négliger la présence de cette coloration violette pouvant provenir soit du dérivé monoacétylé de la benzidine (non confirmé par *hydrolyse*), soit de formes de transition inconnues, peut-être de produits quinoniques, comme l'ont suggéré ENGELBERTZ et BABEL. Par ailleurs, la présence assez inattendue de benzidine libre dans les *microsomes* est intéressante à souligner, en raison de la participation éventuelle de ces derniers aux « processus » de détoxication.

Nous devons enfin ajouter que la présence de saccharose inhibe partiellement le développement de la réaction colorée (de l'ordre de 30 p. 100), mais ceci ne suffit pas pour expliquer les difficultés que nous avons rencontrées et que nous n'avons pu résoudre jusqu'ici.

**Etude
de quelques effets biologiques
de la Benzidine**

Après avoir déterminé chez l'Animal la répartition de la benzidine dans les principaux organes et tenté de préciser sa localisation au niveau des éléments de la cellule hépatique, nous nous sommes efforcés, dans la quatrième partie de notre travail, de rechercher si la benzidine intervenait pour modifier la constitution, le fonctionnement ou la structure de quelques systèmes biologiques essentiels, afin d'essayer, par là, de mettre en évidence quelques signes fonctionnels de l'intoxication.

Nous avons divisé cette quatrième partie en quatre chapitres :

- Le premier chapitre sera consacré à l'étude des effets de la benzidine sur les éléments figurés du sang, et, en particulier, à son rôle éventuel dans la formation de « corpuscules de Heinz » dans les hématies.
- Dans le deuxième chapitre, nous examinerons si la benzidine est susceptible, en tant que représentant du groupe des amines aromatiques, de provoquer la formation de méthémoglobine.
- Dans le troisième chapitre, nous déterminerons l'influence de la benzidine sur la respiration cellulaire de différents tissus par la méthode manométrique de Warburg.
- Enfin, nous exposerons, dans le quatrième et dernier chapitre, quelques résultats histologiques qui nous ont paru intéressants bien que ne concernant pas la vessie. En effet, nous n'avons pas constaté l'apparition de tumeurs vésicales, en raison sans doute de la durée trop réduite de notre expérimentation chez les espèces animales réceptives.

CHAPITRE PREMIER

EFFETS DE LA BENZIDINE SUR LES ÉLÉMENTS FIGURÉS DU SANG

Il nous a semblé intéressant de voir si l'administration de benzidine à faibles doses pendant un temps assez long provoquait, chez l'Animal, des variations de la formule sanguine. Nous pensions que, dans l'affirmative, il y aurait là un moyen non négligeable de surveillance ou de dépistage de l'intoxication chronique. Dans la même direction de recherches, et tenant compte de l'appartenance de la benzidine au groupe des amines aromatiques, nous avons recherché la présence de « corpuscules de Heinz » dans les hématies des animaux traités.

Nos essais ont porté sur le Rat intoxiqué par voie buccale et le Lapin soumis à des badigeonnages avec des solutions de benzidine. Nous avons d'autre part recherché les « corpuscules de Heinz » chez le Chien recevant régulièrement de la benzidine « per os ».

Nous exposerons chacune de ces expérimentations en détail, mais, auparavant, nous pensons qu'il est utile d'exposer brièvement la technique que nous avons suivie pour la mise en évidence des « corpuscules de Heinz » ainsi que pour la production « in vitro » de ces derniers, de façon à disposer de préparations témoins.

I. — LES « CORPUSCULES DE HEINZ »

Ce sont de petits corpuscules ronds, réfringents, que l'on rencontre dans les hématies, en particulier au cours des intoxications par certaines amines.

On peut les produire « in vitro » selon la technique suivante :

Du sang, fraîchement recueilli sur le 1/10^e de son volume d'une solution de citrate de sodium à 4 p. 100, est additionné d'une solution

saturée de *phénylhydrazine* base dans du soluté physiologique (environ le 1/10^e du volume du sang). Après agitation, la préparation est mise, pendant 15 minutes, à l'étuve à 37°.

On prépare, par ailleurs, une solution de sulfate de Bleu de Nil à 0,50 g p. 1.000 dans l'alcool absolu.

Pour l'examen microscopique, on dépose, à l'extrémité d'une lame, une goutte de la solution du colorant qu'on étale et qu'on laisse évaporer, avant d'ajouter une goutte de la préparation sanguine (sang traité par la phénylhydrazine ou sang citraté prélevé sur un individu ou un animal intoxiqué). On recouvre la préparation d'une lamelle assez grande pour qu'elle dépasse le bord de la lame, ceci afin de pouvoir la soulever à plusieurs reprises, ce qui favorise la répartition homogène du Bleu de Nil dans le sang. L'ensemble est laissé pendant une dizaine de minutes dans une chambre humide constituée simplement par une boîte de Pétri contenant quelques gouttes d'eau et un petit support en verre sur lequel repose la lame.

On examine au microscope la préparation étalée entre la lame et la lamelle ; sur un fond bleu verdâtre, on distingue très nettement les hématies et, sur le pourtour de ces dernières, des particules plus foncées en nombre assez variable : ce sont les « corpuscules de Heinz ».

II. — PROTOCOLE D'EXPÉRIENCE

A) CHEZ LE RAT

Dix rats de race « Wistar », d'un poids moyen de 150 g, ont été divisés en deux lots de 5 animaux chacun (lots 1 et 2). Ces rats ont été soumis à un régime homogène contenant de la benzidine purifiée par sublimation. Des numérations globulaires et des formules leucocytaires ont été effectuées régulièrement sur les animaux intoxiqués et, en même temps, sur 5 rats témoins soumis au même régime sans benzidine. De plus, avant le début de l'intoxication, tous les rats avaient subi trois numérations de contrôle.

Le lot n° 1 a reçu un régime contenant 0,125 g de benzidine base, par kilo. La durée de l'intoxication a été comprise entre 68 et 114 jours. Les prélèvements pour numérations, formules leucocytaires, recherche des « corps de Heinz » et aussi détermination du temps de coagulation, ont été effectués deux fois par mois.

Le lot n° 2 a absorbé un régime contenant 0,50 g de benzidine par kilo. L'intoxication a duré 60 jours et les prélèvements ont eu lieu tous les 10 jours.

B) CHEZ LE LAPIN

Quatre lapins mâles, d'un poids voisin de 2,500 kg, ont été soumis à une expérimentation qui avait aussi pour but de mettre en évidence le rôle de l'absorption cutanée. A cet effet, deux animaux ont été, six jours par semaine, quotidiennement badigeonnés à l'intérieur de l'oreille, pendant 4 mois, avec une solution à 2 p. 100 de benzidine dans l'acétate d'amyle. Dans les mêmes conditions, deux autres animaux étaient badigeonnés avec de l'acétate d'amyle seul et servaient ainsi de témoins.

III. — RÉSULTATS

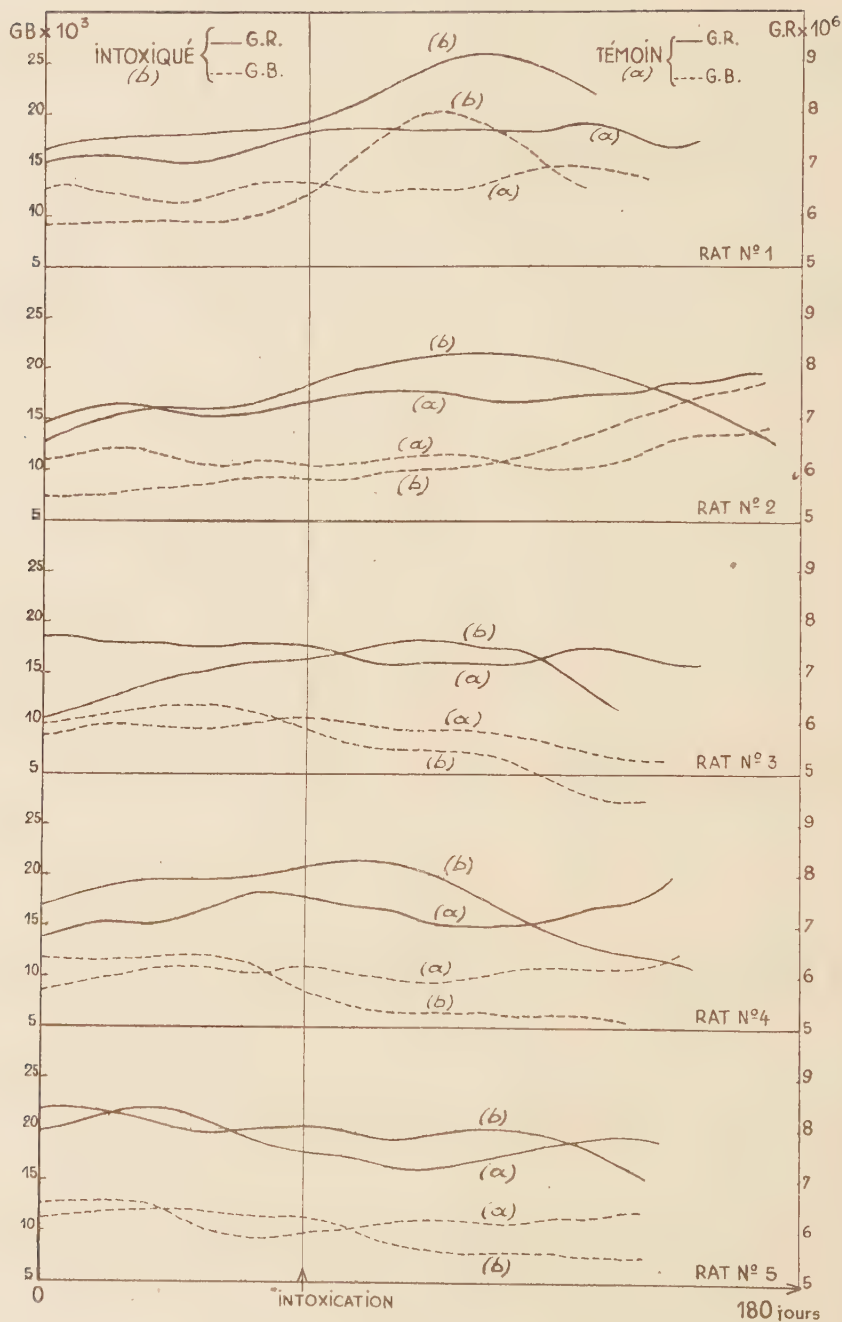
Les résultats que nous avons obtenus pour le lot n° 1 de rats et pour les lapins sont traduits dans les courbes n° 2 et n° 3. Pour cette traduction graphique des résultats, nous avons utilisé une méthode de « compensation » déjà employée par FABRE, TRUHAUT et collaborateurs [65] pour l'étude de certains solvants industriels. Cette méthode consiste à joindre les centres de gravité des triangles successifs déterminés par le contour polygonal du graphique des résultats expérimentaux bruts. Ce procédé présente l'intérêt d'atténuer les variations physiologiques chez l'animal normal, lesquelles sont relativement importantes. Nous n'avons pas jugé utile de représenter graphiquement les résultats concernant le lot n° 2 de rats, car ils n'apportent aucun élément nouveau par rapport aux résultats du premier lot.

A) NUMERATIONS GLOBULAIRES

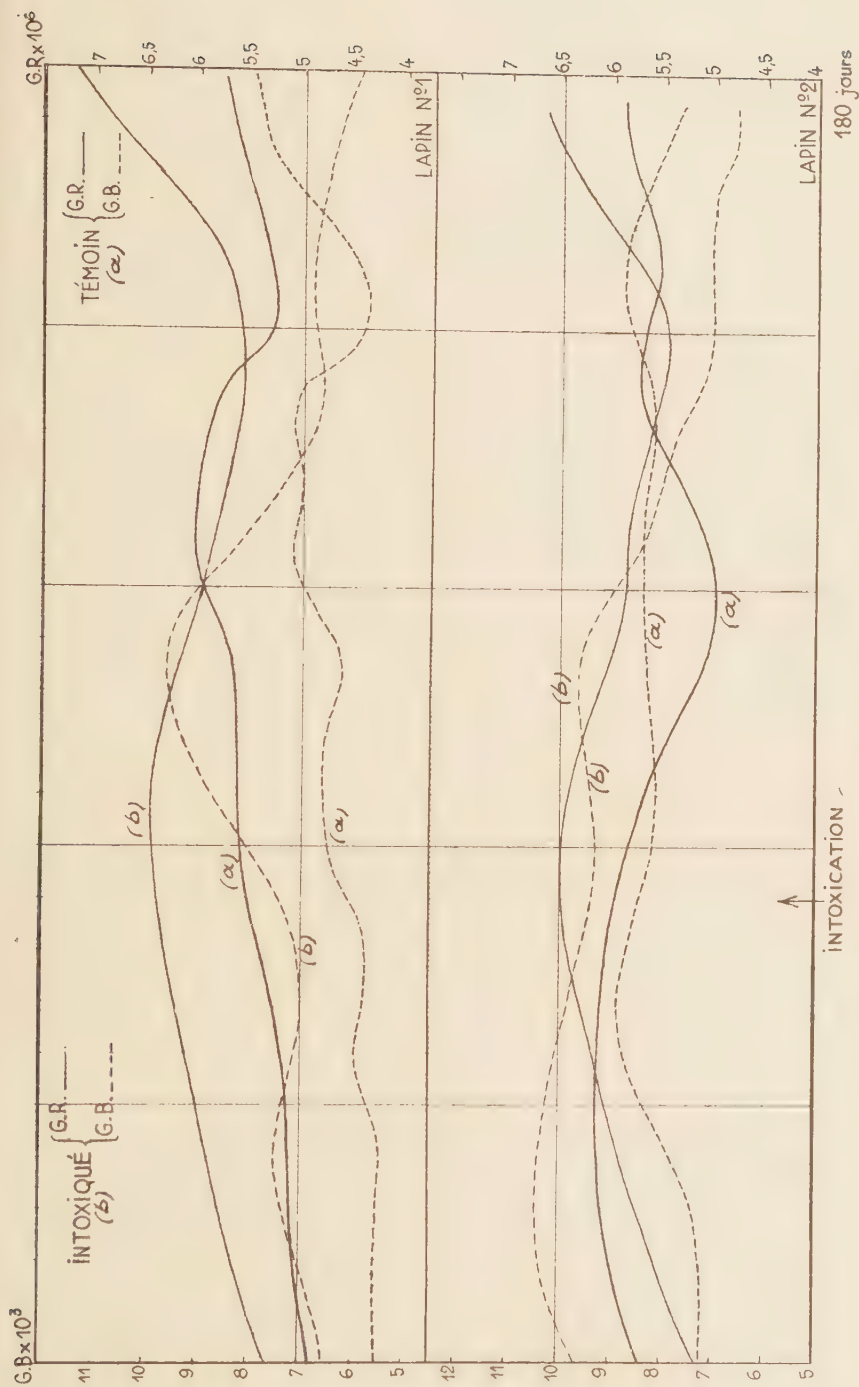
Il est difficile, à la suite de l'examen des tableaux de courbes n° 2 et n° 3, de se faire une opinion précise sur le rôle de la benzidine au niveau de la *lignée rouge*. Il faut pourtant remarquer, chez le Rat, *l'allure généralement descendante* des courbes exprimant la quantité de globules rouges, après une légère élévation dans les premiers jours de l'intoxication. La benzidine semblerait donc provoquer une légère anémie.

Chez le Lapin, l'effet de la benzidine sur le nombre des hématies est, comme le montre le graphique, encore beaucoup moins net que chez le Rat, les variations n'ayant en général aucun caractère systématique.

Au niveau de la *lignée blanche*, on enregistre en général, tant chez le Rat que chez le Lapin, une très légère *leucopénie*, mais là



COURBES N° 2: Courbes des variations hématologiques au cours de l'intoxication chronique par la benzidine chez le Rat



COURBES N° 3 : Courbes des variations hématologiques
au cours de l'intoxication chronique par la benzidine chez le Lapin

encore les variations ne sont pas suffisamment systématiques pour qu'on puisse en tirer des conclusions définies.

B) FORMULES LEUCOCYTAIRES

Chez le Rat, l'administration de benzidine se traduit par une augmentation marquée des polynucléaires et une diminution des lymphocytes. En revanche, le phénomène aurait tendance à être inversé chez le Lapin : diminution des polynucléaires et légère augmentation des lymphocytes.

C) COAGULATION SANGUINE

Parallèlement à nos recherches sur les éléments figurés du sang, nous avons effectué les mesures du temps de coagulation en appliquant la méthode classique du tube capillaire : le sang est prélevé à l'aide d'un tel tube que l'on brise toutes les trente secondes pour apprécier le moment où se manifeste la coagulation.

Les résultats obtenus chez les deux espèces animales n'indiquent pratiquement pas de modification du temps de coagulation.

Nous n'avons, par ailleurs, remarqué aucune variation sensible du nombre des *plaquettes sanguines*.

D) CORPUSCULES DE HEINZ

Au cours de toute notre expérimentation et à l'occasion de tous les prélèvements de sang que nous avons pu effectuer chez différentes espèces animales (Rat, Lapin et Chien), nous n'avons pu mettre en évidence qu'à deux reprises, la présence de « *corpuscules de Heinz* », d'ailleurs chez un seul rat (rat n° 4 du *tableau de courbes n° 2*) soumis au régime contenant 0,125 g de benzidine par kilo. Chez le Chien, nous n'en avons jamais trouvé.

En conclusion, l'intoxication chronique par la benzidine ne provoque chez l'animal (Lapin, Rat) que peu de modifications hématologiques. Tout au plus, peut-on retenir une légère diminution des globules rouges et une tendance à l'inversion de la formule sanguine chez le Rat. Quant aux corpuscules de Heinz, ils n'apparaissent qu'exceptionnellement. Aussi, pensons-nous que la pratique des examens hématologiques périodiques pour le dépistage des imprégnations toxiques chez les ouvriers préposés à la manipulation de la benzidine n'a qu'une valeur très limitée.

ÉTUDE DE L'ACTION DE LA BENZIDINE SUR LE PIGMENT SANGUIN

Comme nous l'avons déjà signalé à plusieurs reprises dans les chapitres précédents, nous étions en droit de penser que la benzidine, en tant que diamine aromatique, pouvait agir comme un agent méthémoglobinisant. Bien que, dans la littérature toxicologique, nous n'ayons relevé aucune constatation clinique en faveur d'une telle action, nous avons voulu vérifier si cette action n'était pas susceptible de se manifester chez des animaux d'expérience.

Nous exposerons successivement la technique que nous avons utilisée pour le dosage de la méthémoglobine et les résultats qu'elle nous a permis d'obtenir.

I. — TECHNIQUE DE DOSAGE DE LA MÉTHÉMOGLOBINE

Nous avons suivi la technique de DOGNON, telle qu'elle est décrite par R. FABRE [62].

Nous croyons utile d'en rappeler brièvement le principe.

Auparavant, nous tenons à préciser que nous avons veillé à effectuer le dosage de façon suffisamment rapide pour que ne puisse intervenir la réduction de la méthémoglobine dans le sang extravasé.

La méthode consiste à évaluer au spectrophotomètre, pour une longueur d'onde déterminée, l'absorption du sang dilué, avant et après addition de ferricyanure de potassium.

On détermine le rapport des densités optiques à une longueur d'onde de 633 m μ , pour un sang normal et pour le même sang après méthémoglobinisation totale par le ferricyanure de potassium.

Ce rapport s'abaisse à mesure que la proportion de méthémoglobine s'élève.

Pour faire cette détermination, on dilue 0,2 ml de sang, dès le prélèvement, dans 0,5 ml d'eau et on ajoute 5 ml de solution tampon à pH 6,4 ; on centrifuge jusqu'à obtention d'un liquide parfaitement limpide. On note l'absorption avant et après addition (90 secondes après) de quelques décigrammes de ferricyanure pulvérisé. La précaution fondamentale à observer est d'opérer très vite.

II. — EXPÉRIMENTATION

A) PROTOCOLE D'EXPERIENCE

Nous avons opéré chez deux espèces animales : le RAT et le LAPIN.

1. CHEZ LE RAT :

Les dosages de méthémoglobine ont été effectués chez quatre animaux de race « Wistar », d'un poids moyen de 200 g, dont trois ont été soumis respectivement à une intoxication aiguë, subaiguë et chronique.

a) Le rat n° 1 a servi de témoin.

b) Le rat n° 2 a reçu, en une seule injection intrapéritonéale, 150 mg/kg de benzidine base en solution dans le propylène-glycol

c) Le rat n° 3 a reçu, dans les mêmes conditions que le rat n° 2, 100 mg/kg de benzidine.

d) Le rat n° 4 a été soumis pendant 92 jours à un régime contenant 0,25 g de benzidine base par kilo.

2. CHEZ LE LAPIN :

Quatre animaux ont été expérimentés :

a) Le lapin n° 1, servant de témoin, n'a subi aucun traitement.

b) Le lapin n° 2 a été badigeonné, quotidiennement, pendant 90 jours, à la face interne des oreilles, avec de l'acétate d'amyle pur.

c) Le lapin n° 3 a subi, dans les mêmes conditions que le lapin n° 2, des badigeonnages, mais avec une solution de benzidine à 2 p. 100 dans l'acétate d'amyle.

d) Le lapin n° 4 a reçu, pendant trois jours, à raison de 100 mg/kg par jour, de la benzidine base en solution dans le propylène-glycol en injection intrapéritonéale.

B) RESULTATS

Nous avons rassemblé les résultats obtenus dans le *tableau XIII*.

TABLEAU XIII
RECHERCHE DE LA MÉTHÉMOGLOBINE

	DENSITÉS OPTIQUES		Rapport	Méthém.
	1 ^{re} lecture	2 ^e lecture		
RAT N° 1 (témoin)	0,150	0,841	5,6	0
RAT N° 2 (150 mg/kg) :				
— Avant	0,156	0,940	6	0
— Après	0,260	0,920	3,53	+
RAT N° 3 (100 mg/kg) :				
— Avant	0,139	0,780	5,5	0
— Après	0,216	0,810	3,8	+
RAT N° 4 :				
— Régime	0,200	1,125	5,6	0
LAPIN N° 1 (témoin) ..	0,042	0,63	15,2	0
LAPIN N° 2 (acétate d'amyle pur)	0,045	0,68	15	0
LAPIN N° 3 (benzidine dans l'acétate d'amyle)	0,047	0,67	14,3	0
LAPIN N° 4 (100 mg/kg pendant 3 jours) :				
— Avant	0,041	0,65	15,8	/ 0
— 5 mn après	0,035	0,70	20	
— 20 mn après	0,043	0,685	15,9	
— 24 h après	0,041	0,63	15,3	

La lecture de ce tableau met en évidence les faits suivants :

- 1° La méthémoglobine apparaît seulement chez le Rat et pas chez le Lapin.
- 2° Les seuls animaux ayant fourni des résultats positifs sont ceux soumis à l'intoxication aiguë. Comme nous l'avons déjà signalé, ce fait est peut-être en parallèle avec les signes physiques que nous avons remarqués lors de l'intoxication aiguë chez cet animal

(troubles de l'équilibre, vertiges, etc.) qui font penser à une anoxémie partielle ou momentanée des centres nerveux supérieurs, alors que, dans les mêmes conditions d'intoxication chez le Lapin, nous n'avons jamais rencontré de troubles de ce genre.

- 3° Dans les deux cas d'intoxication chronique, soit chez le Rat soumis à un régime contenant de la benzidine, soit chez le Lapin badi-geonné régulièrement avec une solution de cette amine, nous n'avons pas pu mettre en évidence de méthémoglobine.

En conclusion de ce chapitre, nous pouvons dire que l'action méthémoglobinisante de la benzidine n'a pu être mise en évidence que chez le Rat et seulement au cours des intoxications aiguës. Elle ne se manifeste ni chez le Rat, ni chez le Lapin au cours des intoxications chroniques.

ÉTUDE DE L'ACTION DE LA BENZIDINE SUR LA RESPIRATION CELLULAIRE

Notre étude a surtout porté sur divers homogénats de tissus animaux soumis « in vitro » à l'action de la benzidine. Les quelques tentatives effectuées sur le foie de rats intoxiqués chroniquement par l'amine ne nous ont donné pratiquement aucun résultat, sans doute, comme nous le verrons, en raison de la faible action, même à des concentrations relativement élevées, de la benzidine sur la respiration cellulaire

I. — TECHNIQUE UTILISÉE

Nous avons effectué notre expérimentation sur des homogénats d'organes de Rat obtenus selon la technique de POTTER et ELVEHJEM [134].

La mesure des échanges respiratoires est effectuée selon la méthode classique de WARBURG à la température de 38° et dans l'air atmosphérique.

Les animaux sont sacrifiés par traumatisme crânien et immédiatement autopsiés. L'organe à expérimenter est prélevé, puis découpé en fins morceaux à l'aide de ciseaux. Une partie aliquote de ces fractions d'organes est exactement pesée, puis introduite dans un tube de POTTER maintenu dans un bain d'eau à 38° et contenant une quantité de soluté physiologique de chlorure de sodium telle que la dilution d'organe soit au 1/5. Le broyage s'effectue mécaniquement à l'aide d'une tige reliée à l'axe d'un moteur rotatif et dont la partie inférieure renflée agit par frottement doux sur les parois du tube.

On utilise, par dosage, 1 ml d'homogénat au 1/5, correspondant à 0,20 g de tissu.

La benzidine a été utilisée sous forme de dichlorhydrate et ajoutée au début de l'expérience, les mesures étant faites après un contact et une agitation de 15 minutes pour permettre l'équilibre de température. Chaque expérience était effectuée en présence d'un témoin sans benzidine.

II. — RÉSULTATS

A l'aide de cette technique, nous avons étudié « in vitro », l'action de la benzidine sur les tissus hépatique et cérébral. Ce dernier tissu nous a paru intéressant à cause des symptômes d'ordre nerveux que nous avons constatés chez le Rat intoxiqué d'une façon aiguë et que nous avons attribués, au moins partiellement, à une anoxémie consécutive à la méthémoglobinisation. Des essais pratiqués sur la muqueuse vésicale nous ont donné des résultats contradictoires ; mais il faut tenir compte ici des difficultés rencontrées pour homogénéiser de façon satisfaisante cette paroi musculaire fibreuse.

A) TISSU HEPATIQUE

Nous avons rassemblé, dans le *tableau XIV*, la moyenne des résultats que nous avons obtenus à la suite de plusieurs séries d'expériences.

TABLEAU XIV
INHIBITION DE LA RESPIRATION
DU TISSU HÉPATIQUE DU RAT

EN FONCTION DES CONCENTRATIONS DE BENZIDINE ET DU TEMPS

CONCENTRATIONS ÉVALUÉES EN BENZIDINE BASE	QUANTITÉ D'O ₂ CONSOMMÉ EN μ l POUR 0,20 g DE TISSU HÉPATIQUE FRAIS				
	30 mn	60 mn	90 mn	120 mn	150 mn
0,0100 M	5	7	9	11	16
0,0050 M	8	13	17	21	24
0,0025 M	16	28	36	45	51
0,0020 M	26	43	56	65	70
0,0015 M	35	55	71	83	90
0,0010 M	45	73	95	105	111
0,0005 M	53	82	99	106	117
0	40	75	110	130	138

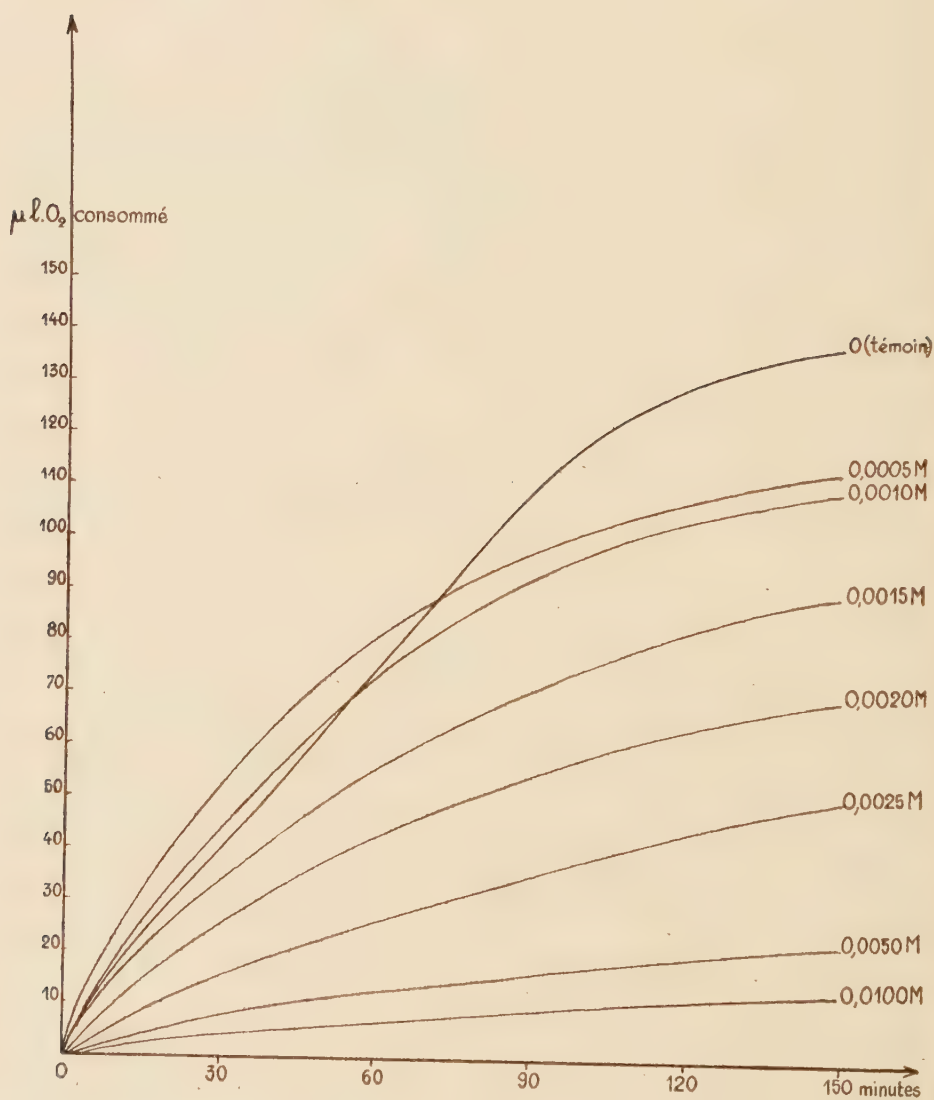
B) TISSU CÉRÉBRAL

Les résultats que nous avons obtenus sont voisins de ceux que nous avons indiqués pour les homogénats de foie, comme le montre le *tableau XV*.

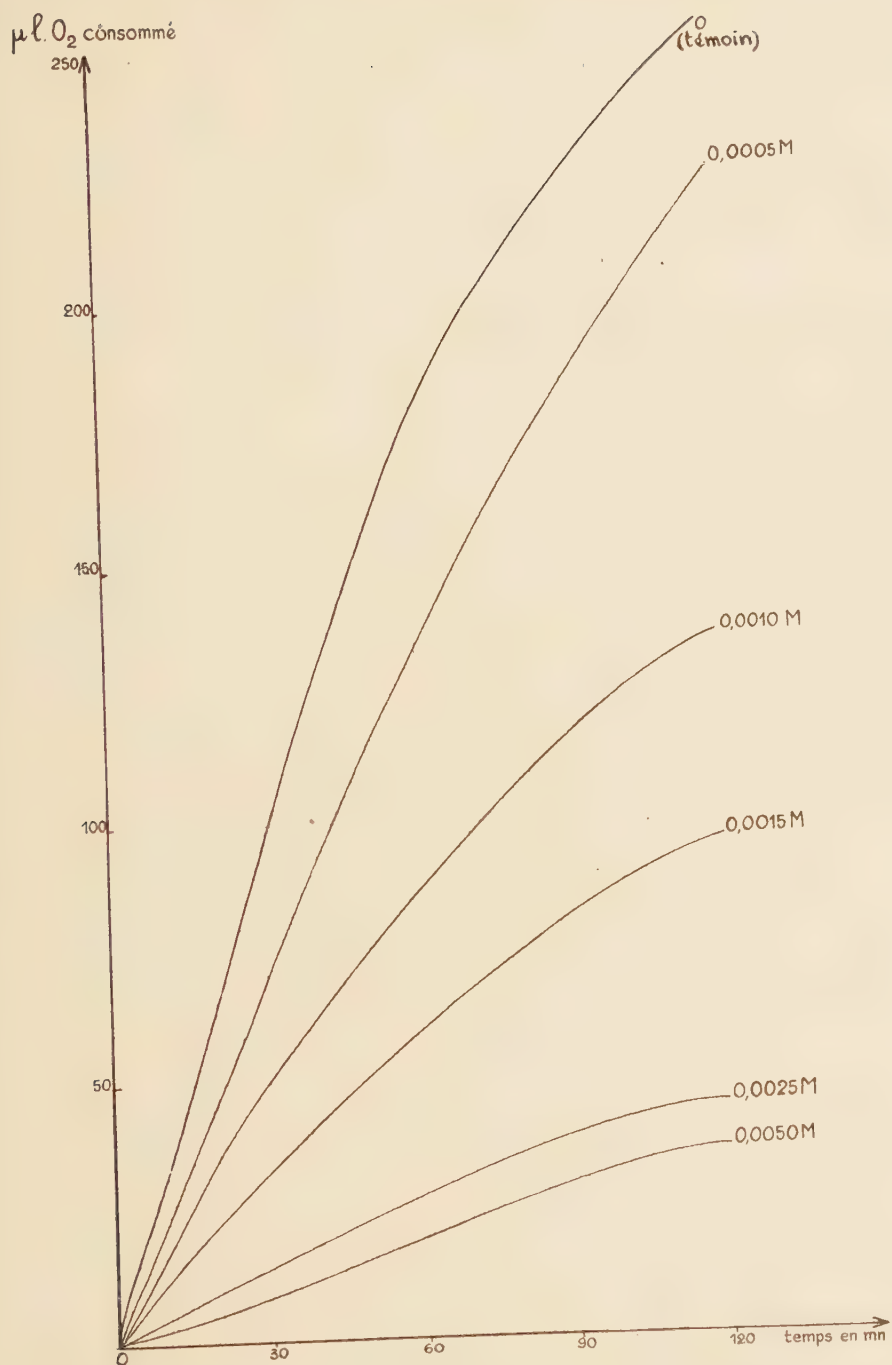
TABLEAU XV
INHIBITION DE LA RESPIRATION
DU TISSU CÉRÉBRAL DU RAT
EN FONCTION DES CONCENTRATIONS DE BENZIDINE ET DU TEMPS

CONCENTRATIONS ÉVALUÉES EN BENZIDINE BASE	QUANTITÉ D'O ₂ CONSOMMÉ EN μ l POUR 0,20 g DE TISSU CÉRÉBRAL FRAIS				
	30 mn	60 mn	90 mn	120 mn	
0,0050 M	8	19	30	37	
0,0025 M	14	29	40	46	
0,0015 M	32	60	82	97	
0,0010 M	50	88	118	137	
0,0005 M	70	130	187	230	
0	92	180	225	260	

L'examen de ces tableaux et de l'ensemble des *courbes n° 4* et des *courbes n° 5* appelle peu de commentaires : le fait marquant est l'action inhibitrice qu'exerce la benzidine sur la respiration cellulaire à des concentrations, à vrai dire, relativement élevées (1,84 g p. 1.000). Aux concentrations très basses, on observe paradoxalement une légère activation, ce qui rappelle les observations dans le même sens faites par TRUHAUT [165] dans le cas du thallium. Remarquons également que le tissu cérébral paraît un peu plus sensible que le tissu hépatique, peut-être en raison de son intensité respiratoire nettement plus élevée au départ.



COURBES N° 4 : Inhibition de la respiration du *tissu hépatique* en fonction des concentrations de benzidine et du temps



COURBES N° 5 : Inhibition de la respiration du *tissu cérébral* en fonction des concentrations de benzidine et du temps

CHAPITRE QUATRIEME

MODIFICATIONS HISTOLOGIQUES

A la suite de nos essais de répartition du toxique au cours de *l'intoxication chronique expérimentale* (Cf : III^e partie, 1^{er} chapitre), différents organes ont été prélevés en vue de l'examen histologique chez le *Rat* (soumis à un régime contenant de la benzidine), chez le *Lapin* (badigeonné avec une solution de benzidine) et aussi chez le *Chien*.

Nous avons, en effet, administré « per os », sous forme de cachets ou de comprimés, de la benzidine à un chien d'un poids de 6,500 kg, six jours par semaine, à raison de 0,10 g par jour pendant la première moitié de l'expérimentation et de 0,40 g par jour pendant la seconde moitié. Le traitement a duré près de 20 mois. L'animal est mort au bout de ce temps, par suite d'étouffement dû à la présence, au niveau du cou et dans la partie sublinguale, d'une excroissance qui, peu à peu, a obstrué les voies respiratoires. L'autopsie et l'examen histologique n'y ont mis en évidence, à côté de phénomènes congestifs, qu'un état de nécrose du tissu conjonctif, sans révéler de traces d'une structure anarchique.

A vrai dire, en aucun cas, nous n'avons pu obtenir la production de tumeurs vésicales chez les espèces animales expérimentées. Nous avons pourtant jugé bon de présenter les modifications apparues au cours de l'examen histologique des différents organes.

1) FOIE

Chez toutes les espèces, on observe un *état congestif* plus ou moins marqué.

Chez le *Chien*, nous avons noté, à l'autopsie, une *hypertrophie* accentuée de la vésicule biliaire qui est sans doute en relation avec une abondante sécrétion de bile, nécessaire pour éliminer le toxique, du moins en partie.

2) REIN

Le fait important est l'installation, à la suite de l'intoxication prolongée à la benzidine, d'une *néphrite subaiguë chronique*.

Chez le Rat, recevant un régime contenant 0,50 g d'amine aromatique par kilo, ainsi que chez le Lapin soumis à des badigeonnages quotidiens avec une solution de benzidine dans l'acétate d'amyle, nous avons constaté, en outre, la présence de *cyindres hématuriques*. Au sujet de cette dernière expérimentation, nous devons signaler que les animaux témoins, badigeonnés à l'acétate d'amyle seul, ont présenté aussi des signes de néphrite, mais moins accentués que chez les animaux traités à la benzidine.

Chez le Chien, l'examen histologique du rein a permis de déceler une *glomérulo-néphrite-épithéliale*, accompagnée de *nécrose massive* de l'épithélium des tubes contournés.

Nous présentons, à la fin de ce chapitre, la photographie (fig. 3) d'une coupe du tissu rénal, montrant nettement la turgescence d'un glomérule et les phénomènes de nécrose.

Cette atteinte du rein cadre avec les constatations cliniques ou expérimentales de la plupart des auteurs, que nous avons signalées au cours de la première partie de notre travail.

3) RATE

Les coupes histologiques de rate ont permis de déceler, chez le Rat et le Lapin, une *splénite subaiguë chronique* ainsi qu'un faible état congestif chez deux rats soumis au régime contenant 0,50 g de benzidine par kilo.

Chez le Chien, nous avons constaté à l'autopsie une hypertrophie de cet organe et l'examen histologique a révélé la présence de *phénomènes hémorragiques marqués*.

4) POUMON

Au niveau du tissu pulmonaire, une alvéolite de faible importance a été découverte chez quelques rats et quelques lapins. Chez le Chien, nous avons remarqué un état d'*œdème* considérable qu'il nous est difficile d'expliquer.

5) AUTRES ORGANES

Parmi les autres organes prélevés et examinés (cœur, surrénales, thyroïde, cerveau, cervelet, organes génitaux et tout particulièrement

vessie), nous n'avons à signaler, en dehors de quelques lésions de la muqueuse gastrique chez le Chien, aucune *modification histologique*.

En conclusion de ce chapitre, nous pouvons dire que si l'examen histologique ne nous a pas permis de mettre en évidence de formes tumorales, en particulier au niveau de la vessie, il a du moins confirmé la localisation et précisé le mode d'action de la benzidine au niveau du foie et du rein.

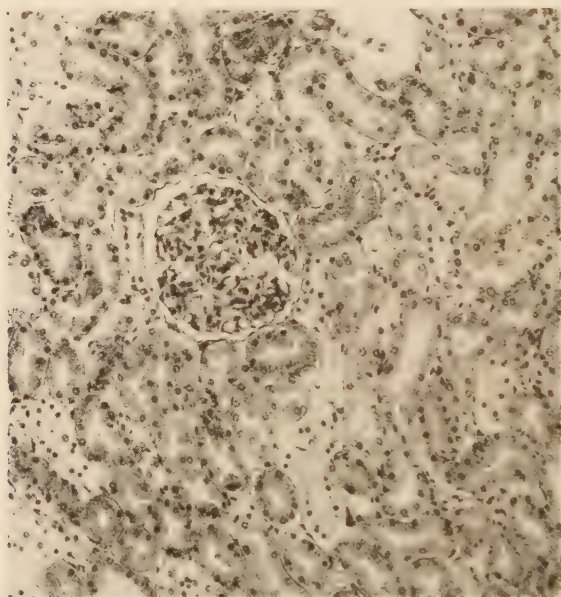


FIGURE 3

REIN : Turgescence d'un glomérule et nécrose massive
par places de l'épithélium des tubes et notamment
des tubes contournés

**Etude du métabolisme de la Benzidine
chez les différentes espèces animales.
Son rapport avec l'action cancérigène**

La cinquième partie de notre travail, de très loin la plus importante, concerne l'étude du métabolisme de la benzidine chez les différentes espèces animales.

Nous avons déjà dit combien les chercheurs qui se sont attachés à l'étude des modalités et des mécanismes d'action des amines aromatiques cancérigènes, en particulier TRUHAUT [166 - 167], accordaient d'importance, en raison même de la localisation des tumeurs au niveau de la paroi vésicale, à la connaissance des formes d'élimination urinaire de ces agents chimiques.

Les très nombreux travaux effectués sur un autre représentant du groupe des amines aromatiques, la β -naphtylamine, donnent, par analogie, une idée de cette importance ; c'est pourquoi nous nous permettons de rappeler brièvement les principaux métabolites isolés, à côté de la β -naphtylamine elle-même, à partir des urines de différents animaux soumis à l'action de cette amine :

— *L'amino-2 naphтол-1* identifié par ENGEL [59] chez le Chien.

— *L'acide amino-2 naphtylsulfurique-1* trouvé par WILEY [186] chez le Chien, par MANSON et YOUNG [115] chez le Rat, puis par TWOMBLY [171], expérimentant avec de la β -naphtylamine marquée au carbone radioactif, chez le Chien, et, très probablement, chez le Rat, le Lapin et l'Homme.

— *L'acétamido-2 naphталène* et *l'acétamido-2 naphтол-6*, mis en évidence dans les urines de Rat, Lapin et de Singe par DOBRINER, HOFMANN et RHOADS [50] qui confirmèrent, peu après, la présence de *l'amino-2 naphтол-6* dans ces mêmes urines.

— Chez le Rat, MANSON et YOUNG retrouvèrent le composé acétylé sur la fonction amine, mais ils doutèrent de la présence, du moins en quantité appréciable, de *l'acétamido-2 naphталène*. Ce dernier composé administré à des rats par voie buccale se retrouve dans les urines des animaux surtout sous forme de β -naphtylamine et d'*acétamido-2 naphтол-6*.

Il est à noter que tous ces composés existent sous forme de conjugués le plus souvent sulfuriques ou glucuroniques.

À côté des recherches « *in vivo* », un certain nombre d'expériences ont été effectuées « *in vitro* », en faisant agir sur la β -naphtylamine des coupes de divers organes et, en particulier, de foie et de rein. Il faut citer, à cet égard, les travaux de BOOTH, BOYLAND et MAN-

SON [28], qui ont précisé le rôle de ces deux organes dans la formation des dérivés sulfamiques ou acétylés de l'amine.

Comme nous l'avons dit dans notre introduction, les essais concernant la benzidine sont loin d'être aussi complets ; de plus, les données existantes sont souvent contradictoires. Aussi avons-nous jugé indispensable, avant de passer à l'exposé de notre expérimentation, de présenter dans un premier chapitre, une mise au point, sous forme d'historique, des essais pratiqués jusque-là, concernant le métabolisme de la benzidine et de certains de ses dérivés en liaison avec leur pouvoir cancérigène.

Notre expérimentation ayant largement utilisé les ressources de la chromatographie sur papier, nous exposerons dans le deuxième chapitre la méthode générale que nous avons suivie pour la recherche des métabolites à partir des urines d'animaux.

Le troisième chapitre sera consacré à l'exposé et à la discussion des résultats de notre étude expérimentale du métabolisme de la benzidine chez le *Chien*, le *Lapin*, le *Rat* et le *Cobaye*.

CHAPITRE PREMIER

DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES CONCERNANT LE MÉTABOLISME DE LA BENZIDINE

Le problème du métabolisme de la benzidine se présente sous un double aspect :

— D'une part, *un aspect analytique* comportant l'étude des produits de transformation de la benzidine qui apparaissent dans l'urine à la suite de l'absorption de l'amine, soit par l'Homme, soit surtout par des animaux.

— D'autre part, *un aspect biologique* comportant l'étude de l'action sur l'animal, et, en particulier, de l'action cancérigène éventuelle, soit de métabolites isolés de l'urine, soit de produits de synthèse supposés être des métabolites de la benzidine.

Dans l'exposé des résultats antérieurement acquis, nous envisagerons chacun de ces deux aspects, en spécifiant toutefois que, dans certaines expériences, ils sont envisagés simultanément.

I. — RECHERCHES A PRÉDOMINANCE ANALYTIQUE

D'après ENGELBELTZ et BABEL [60], le premier auteur qui se soit intéressé à l'élimination urinaire de la benzidine est KLINGENBERG. En 1891, cet auteur administra, à un *chien*, 1 g de l'amine par voie buccale. Faisant agir l'eau de brome sur le résidu d'extraction de l'urine par le sulfure de carbone, il obtint une coloration bleu-verdâtre qu'il attribua à la *benzidine libre* sans pouvoir caractériser de métabolites.

En 1908, ADLER [4], que nous avons déjà cité, ne retrouva aucune trace de benzidine dans l'urine de 24 heures d'un chien auquel

il avait administré 1 g de l'amine par voie orale. En revanche, le même auteur isola, du sédiment de l'urine de *lapin* soumis à un régime contenant de la benzidine, un *dérivé dihydroxylé* de cette base, c'est-à-dire un dihydroxy-diamino-biphényle dont il ne put déterminer la structure exacte.

En 1920, KUCHENBECKER [104], chez le même animal, contesta la présence de ce dérivé hydroxylé et envisagea l'éventualité d'une acétylation.

Huit ans plus tard, WEBER et HEIDPRIM [182] mirent en évidence, dans les extraits chloroformiques d'urines de *chiens* soumis à l'injection de dichlorhydrate de benzidine, la base à l'état libre, en faisant appel à la réaction colorée par oxydation à l'eau de brome et à la précipitation à l'état de sulfate ; ils envisagèrent, par ailleurs, l'éventualité de la formation de dérivés sulfamiques et glucuroniques de l'amine.

En 1947, GOLDBLATT [76] reprit l'idée de KUCHENBECKER et suggéra que la benzidine pouvait s'éliminer dans l'urine partiellement sous forme acétylée.

En 1950, BAKER [10] isola, de l'urine d'*ouvriers* manipulant la benzidine, une substance qu'il considéra, à la suite d'ADLER, comme un dihydroxy-diamino-biphényle.

La méthode utilisée par BAKER était la suivante : l'urine était déshydratée par action du froid sous vide. Le résidu était ensuite soumis à la chromatographie. Après révélation des spots, l'auteur put ainsi mettre en évidence, à côté de faibles quantités de benzidine libre et d'ortho-amino-phénol, un produit de transformation ayant un point de fusion compris entre 136° et 138°, qu'il supposa être le dihydroxy-3, 3' diamino-4, 4' biphényle.



Il put, en effet, obtenir des chromatogrammes *identiques* en soumettant à la chromatographie, d'une part, la substance isolée des urines d'*ouvriers*, d'autre part, le produit de synthèse répondant à la structure ci-dessus, mais ce dernier produit avait un point de fusion compris entre 270° et 280°, bien supérieur par conséquent à celui de la substance isolée de l'urine. Celle-ci pourrait donc posséder plusieurs structures possibles et, comme l'indique l'auteur, on aurait affaire :

— soit à un dihydroxy-3, 3' diamino-4, 4' biphényle *impur* (contenant en particulier de l'ortho-amino-phénol) ;

- soit à un dihydroxy-x, x' diamino-4, 4' biphényle de structure inconnue ;
- soit à une substance totalement inconnue.

L'auteur ajoute, à la fin de sa publication, qu'il a pu identifier le dihydroxy-3, 3' diamino-4, 4' biphényle.

Se basant sur ce résultat, il eut l'idée d'administrer cette substance, reproduite par synthèse et mise en solution huileuse, à des souris, par voie sous-cutanée. Les injections étaient pratiquées trois fois par semaine à raison de 100 mg de dérivé hydroxylé par injection. Parallèlement, un autre lot d'animaux était soumis à des injections de benzidine.

Au bout de 45 semaines, l'auteur constata que seuls les animaux traités par le dihydroxy-3, 3' diamino-4, 4' biphényle présentaient des tumeurs de la vessie : sur 9 souris survivantes, 5 étaient atteintes de tumeurs bénignes et 2 de tumeurs malignes. Aucune tumeur vésicale, même bénigne, ne put être décelée chez les animaux soumis à la benzidine, parmi lesquels apparurent, en revanche, un certain nombre d'hépatomes.

En 1953, ENGELBERTZ et BABEL [60], utilisant la méthode que nous avons antérieurement mentionnée, ont étudié le sort de la benzidine administrée, à raison de 0,10 g par jour, par voie buccale, chez le *Chien* et chez le *Lapin*. Ils ont caractérisé, dans l'urine des animaux traités, de la *benzidine libre*, ainsi que des dérivés *mono* et *diacétylés* et, en même temps, mais seulement chez le *Lapin*, l'amino-4 hydroxy-4' biphényle.

Poussant plus loin leur investigation, ENGELBERTZ et BABEL ont fait absorber aux animaux le dérivé diacétylé de la benzidine et ont constaté que ce dernier était éliminé dans l'urine, en partie, sous forme de dérivé monoacétylé et même de benzidine libre. Les auteurs pensèrent alors que, dans un premier temps, la benzidine base était entièrement acétylée dans l'organisme, puis dans un second temps, saponifiée, ce qui expliquerait la présence de benzidine libre, au moins partiellement, car ils supposèrent aussi qu'une partie de la benzidine absorbée pouvait ne pas être attaquée.

Ils ont ajouté dans leurs conclusions que, d'une part, ils n'avaient pu identifier la dihydroxy-benzidine de BAKER et que, d'autre part, ils n'étaient pas parvenus à caractériser d'autres produits intermédiaires du métabolisme de la benzidine, vraisemblablement de *type quinonique*, parce que en trop faibles quantités dans les urines.

Plus récemment, enfin, BRADSHAW et CLAYSON [30] ont soumis à la chromatographie sur papier des urines de *Chien* recevant « *per os* » 0,50 g de benzidine par jour. Ils ont mis en évidence la pré-

sence de trois « spots » principaux et ils ont pu identifier, à côté de la *benzidine libre* et de son dérivé hydroxylé en position 3, l'acide diamino-4 4' biphényl-sulfurique-3.



Les auteurs ajoutent que l'hydroxy-3 benzidine n'est qu'un métabolite mineur qui n'a été retrouvé que dans quelques échantillons d'urines et que les autres métabolites n'ont pu être identifiés.

II. — RECHERCHES A ORIENTATION PLUS SPÉCIALEMENT BIOLOGIQUE

MILLER, SANDIN, MILLER et RUSCH [123] ont étudié l'action cancérogène chez le *Rat* de 20 composés de synthèse, tous dérivés du biphényle et parmi lesquels nous citerons comme se rapprochant le plus à notre avis, des formes possibles de transformation métabolique de la benzidine :

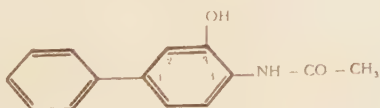
1) l'acétylamino-4 biphényle :



2) l'hydroxy-3 amino-4 biphényle :



3) l'hydroxy-3 acétylamino-4 biphényle :



4) la diacétyl N N'-benzidine :



Les auteurs, après avoir sommairement exposé la préparation de chacun de ces composés, indiquent la technique expérimentale qu'ils ont suivie : en général, les produits étaient administrés par voie orale, mêlés à la nourriture ; l'expérimentation a duré de 8 à 10 mois.

Dans ces conditions, sur 31 femelles soumises à un régime contenant l'acétylamino-4 biphényle, 24 ont présenté des adénocarcinomes de la glande mammaire, 2 des adénocarcinomes du petit intestin et 2 autres des tumeurs du conduit auditif.

L'hydroxy-3 amino-4 biphényle et l'hydroxy-3 acétylamino-4 biphényle ne se sont pas révélés cancérigènes.

En revanche, la diacétylbenzidine s'est révélée extrêmement nocive du point de vue rénal, puisque, sur 18 animaux en expérience, 16 sont morts par suite de glomérulonéphrites accompagnées d'une abondante protéinurie, faits déjà constatés par HARMAN, MILLER et MILLER [80]. Quant aux deux animaux survivants, ils étaient porteurs de tumeurs du conduit auditif.

Parmi les autres produits étudiés, le fluoro-4' acétylamino-4 biphényle



provoqua l'apparition de tumeurs du foie chez 5 rats mâles sur un total de 7 traités.

Enfin, dans le groupe des dérivés méthylés de la diacétylbenzidine, seules la méthyl-2 diacétylbenzidine et la diméthyl-3, 3' diacétylbenzidine ont manifesté un pouvoir cancérigène surtout au niveau du conduit auditif.

Les auteurs ont étudié, en outre, le rôle joué par les groupements hydroxylés, mais ils ont estimé que la relation entre le pouvoir cancérigène vésical et la formation de certains composés phénoliques, envisagés comme métabolites, restait à démontrer.

En conclusion de ce chapitre concernant, d'une part, l'étude du métabolisme de la benzidine chez les différentes espèces, et, d'autre part, l'exposé des expérimentations effectuées chez l'animal à l'aide de substances de synthèse pouvant être considérées en raison de leur structure comme des « métabolites possibles » de la benzidine, nous dirons que le problème se présente sous un aspect extrêmement complexe.

CHAPITRE DEUXIEME

RECHERCHES PERSONNELLES PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX EXPOSÉ DE LA TECHNIQUE CHROMATOGRAPHIQUE UTILISÉE

I. — PRÉPARATION DU MATÉRIEL BIOLOGIQUE

Comme nous l'avons indiqué, nous avons effectué nos essais sur les urines de *Chien*, de *Lapin*, de *Cobaye* et de *Rat*. Les animaux, soumis à un régime normal, ont reçu la benzidine soit par voie buccale, sous forme de cachets ou comprimés mêlés à la nourriture (*Chien*, *Rat*), soit par voie intrapéritonéale, en solution dans le propylèneglycol (*Lapin*, *Cobaye*, *Rat*).

L'utilisation de cages conçues pour la récolte des urines nous a permis, en fractionnant les émissions, de pouvoir chromatographier, à chaque instant, les composants de l'urine. En général, nous avons soumis à l'analyse les urines de 24 heures.

Les urines recueillies étaient, soit extraites aussitôt par un solvant, en général la butanone, soit conservées le minimum de temps au réfrigérateur avant d'être chromatographiées. En effet, nous avons jugé préférable de chromatographier l'urine elle-même, sans extraction préalable, ceci en raison de l'éventuelle fragilité des métabolites risquant d'être détruits ou modifiés au cours des opérations d'isolement.

Dans tous les cas, nous avons effectué les essais sur les urines d'animaux traités, en présence de deux groupes d'urines « témoins », l'un constitué par une urine d'un animal de la même espèce n'ayant subi aucun traitement, l'autre par cette même urine surchargée en benzidine ou ses dérivés.

De même, dans l'étude des extraits d'organes des animaux intoxiqués, des solutions obtenues par épuisement, avec le même solvant, des organes d'animaux témoins, étaient parallèlement soumises à la chromatographie.

II. — MATÉRIEL CHROMATOGRAPHIQUE ET RÉALISATION DU CHROMATOGRAMME

A) MATÉRIEL

Après quelques essais de chromatographie ascendante qui ne nous ont pas donné satisfaction, nous avons adopté la technique de *chromatographie descendante*.

Le matériel utilisé pour la réalisation des chromatogrammes comprend la cuve à chromatographie proprement dite, le solvant, le papier et le révélateur.

1. LA CUVE :

Nous avons utilisé une cuve en verre de dimensions intérieures suivantes : longueur 33 cm, largeur 18 cm, hauteur 48 cm. A l'intérieur de cette cuve, deux supports de verre soutiennent l' « auget » destiné à recevoir le solvant. Les bords supérieurs sont rôdés de telle sorte que le couvercle, en verre, lui aussi, s'y adapte parfaitement.

2. LE SOLVANT :

Nous avons expérimenté 10 systèmes de solvant :

Alcool amylique - eau

- « - eau - acide chlorhydrique
- « - eau - soude
- « - eau - ammoniacale
- « - eau - pyridine
- « tamponné

Alcool butylique - eau

- « - eau - soude
- « - eau - acide acétique
- « - eau - acide chlorhydrique

C'est ce dernier solvant qui nous a donné les meilleurs résultats et que nous avons retenu pour notre étude.

Il se prépare selon la formule suivante :

Dans une ampoule à décantation, ajouter dans l'ordre :

- Alcool butylique (Eb : 117,5°) : 200 ml
- Eau distillée : q.s.p. saturer (environ 40 ml)

Laisser reposer, puis soutirer, s'il est nécessaire, l'eau en excès et ajouter :

- Acide chlorhydrique fumant : 40 ml.

Agiter et laisser au repos, au moins 12 heures avant l'emploi, à la température de la pièce où se tient la cuve à chromatographie.

Ce solvant doit être renouvelé fréquemment, car l'estérification de l'alcool par l'acide chlorhydrique est assez rapide (3 à 4 jours) et les résultats obtenus avec un solvant estérifié sont différents.

3. LE PAPIER :

Parmi les papiers que nous avons essayés : Arche, Durieux, Whatman, c'est ce dernier qui nous a semblé le mieux convenir à notre étude.

Nous avons employé le papier *Whatman n° 1* qui est un papier à vitesse d'écoulement moyen.

Le stockage de ce papier est important à considérer ; il faut garder les feuilles non seulement à l'abri de la poussière, mais aussi à l'abri de tout gaz ou vapeur susceptibles d'imprégner la fibre de cellulose, donc de modifier la vitesse d'écoulement du solvant.

Les feuilles utilisées sont coupées en deux dans le sens de la longueur et découpées de telle sorte qu'elles aient 45 cm de long sur 23 cm de large. La ligne de départ, sur laquelle sont déposées les solutions de substances à chromatographier ou les gouttes d'urine, est tracée à 9 cm d'un des bords de la feuille dans le sens de la largeur.

Sur cette ligne, les points de départ sont espacés de 4 cm.

4. LE RÉVÉLATEUR :

Nous avons tenté, pour la révélation des « spots » obtenus, de réaliser sur papier la formation d'un azoïque suivant la technique que nous avons décrite plus haut (cf : 2^e chapitre de la II^e partie), mais les essais se sont révélés longs et souvent infructueux. Aussi avons-nous utilisé la *paradiméthylaminobenzaldéhyde* en solution dans l'alcool chlorhydrique (R. d'Ehrlich) correspondant à la formule suivante :

- Paradiméthylaminobenzaldéhyde : 1 g
- Alcool à 95° : q.s.p. pour dissoudre
- Acide chlorhydrique pur (ajouté goutte à goutte) : 15 ml

On obtient ainsi une solution limpide colorée en jaune paille, que l'on applique sur le chromatogramme séché, à l'aide d'un vaporisateur. Ce révélateur présente plusieurs avantages : il est d'abord d'un maniement facile et la coloration des « spots » est pratiquement instantanée. De plus, il provoque avec la benzidine ou ses dérivés, des colorations très vives variant du jaune au rouge orangé ; à ce sujet, il est intéressant de signaler que, dans les essais que nous avons effectués, les colorations *jaunes* correspondaient à la présence dans la molécule d'un seul groupement NH_2 libre (aminobiphényle, naphtylamines, o. toluidine, monoacétylbenzidine, etc.), tandis que les colorations *orangées* apparaissaient avec des molécules comprenant au moins deux groupements aminés libres, mais fixés sur des carbones différents tels que la benzidine et le dihydroxy-3, 3' diamino-4, 4' biphényle. L'urée se colore d'abord en jaune, puis vire peu à peu au bleu. Enfin, les colorations obtenues à l'aide de ce révélateur présentent l'avantage d'être très tenaces et pratiquement indélébiles, ce qui permet de conserver intacts pendant longtemps les chromatogrammes révélés. Signalons que le réactif d'EHRlich réagit peu avec les composants normaux de l'urine (pigments en particulier) et qu'ainsi les colorations parasites pouvant fausser l'interprétation des chromatogrammes ne sont pas à craindre. Seule, comme nous venons de le dire, l'urée donne un « spot » coloré.

Dans le but de révéler d'une façon plus spécifique les groupements *OH* de dérivés hydroxylés éventuels, nous avons utilisé, soit une solution de chlorure ferrique à 1 p. 100, soit une solution de p. nitraniline, mais, dans les deux cas, nous nous sommes heurtés au manque de sensibilité de ces réactifs appliqués sur papier.

B) REALISATION DU CHROMATOGRAMME

Les feuilles de papier Whatman, préparées comme nous l'avons indiqué plus haut, sont prêtes à recevoir les substances à chromatographier. Ces dernières, mises préalablement en solution, sont déposées sur la ligne de départ à l'aide d'un tube capillaire, en veillant à ce que la tache produite sur le papier ne dépasse pas 1 cm de diamètre. On a intérêt à utiliser des solvants volatils, tels que l'éther, l'acétone, l'alcool ou la butanone, lorsqu'il s'agit de produits purs cristallisés servant à la réalisation des spots « témoins ». Par contre, quand il s'agit d'une solution aqueuse (pour les chlorhydrates d'amines par exemple) ou d'urine, il est utile, pour activer l'évaporation de l'eau, d'utiliser un courant d'air tiède fourni par un séchoir à main.

Le papier ainsi traité est placé dans la cuve où on le laisse séjourner pendant quelques heures avant d'introduire le solvant. La tempé-

rature de la pièce durant le temps de l'opération est maintenue entre 20° et 21°. Le temps de course du solvant est en général de 20 heures. Au bout de ce temps, le chromatogramme est retiré de la cuve, puis séché à une température inférieure à 60° avant d'être révélé à la p. diméthylaminobenzaldéhyde.

Nous rappellerons que, dans le cas de l'urine en particulier, nous avons toujours opéré en présence d'urines témoins recueillies, soit chez l'animal avant traitement, soit chez un animal de la même espèce, non traité et recevant la même nourriture que l'animal intoxiqué.

CHAPITRE TROISIEME

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DU MÉTABOLISME DE LA BENZIDINE CHEZ L'ANIMAL EXPOSÉ ET DISCUSSION DE NOS RÉSULTATS *

Notre étude sur le métabolisme de la benzidine a porté, soit sur les organes, soit surtout sur les urines de diverses espèces animales intoxiquées.

Parmi les *organes*, seul le *foie* nous a fourni des résultats intéressants ; nous les avons d'ailleurs complétés par des essais « in vitro » à partir d'homogénats de cet organe additionnés de benzidine.

Quant à l'*élimination urinaire* de la benzidine et de ses métabolites, nous l'avons successivement étudiée du point de vue qualitatif et du point de vue quantitatif chez le *Chien* et le *Lapin* et uniquement du point de vue qualitatif chez le *Cobaye* et le *Rat*.

I. -- ÉTUDE SUR LE TISSU HÉPATIQUE

A) ANIMAUX INTOXIQUÉS

Nos essais ont porté sur une partie aliquote des extraits butanoliques de foie d'animaux intoxiqués nous ayant servi à pratiquer le dosage chimique de la benzidine. Avant d'être soumis à la chromatographie, ces extraits étaient concentrés sous vide à douce température.

(*) Cette partie du travail a fait l'objet d'une communication présentée par R. TRUHAUT et R. PROST, « Recherches sur le métabolisme de la benzidine en relation avec son action cancérogène », au 7^e Congrès international du Cancer ; Cf. Résumés des communications présentées p. 183.

Cette communication a été suivie de la rédaction d'un mémoire détaillé, actuellement sous presse.

Nous avons ainsi pu déceler :

— Chez le *Rat*, recevant un régime contenant 0,50 g de benzidine base par kilo, de la *benzidine libre*.

— Chez le *Rat*, intoxiqué, par voie sous-cutanée, par le dichlorhydrate de benzidine en solution dans du soluté isotonique, à raison de 70 mg/kg, pendant 4 jours, de la *benzidine libre* et, surtout, les dérivés *mono* et *diacétylés*.

— Chez le *Lapin*, soumis à une intoxication subaiguë (50 mg/kg par jour en injection intrapéritonéale, pendant une semaine), la *base libre* ainsi que son *dérivé diacétylé*.

— Chez le *Cobaye*, ayant reçu, en deux injections, 50 mg de benzidine, des traces de la *base libre* et les *dérivés acétylés*.

De plus, chez ce dernier animal, nous avons pu chromatographier la *bile* recueillie à l'intérieur même de la vésicule biliaire, au moment de l'autopsie : les chromatogrammes ont mis en évidence, la présence, à côté de *benzidine libre*, des dérivés *mono* et *diacétylés* en quantités importantes.

* *

Ces résultats nous permettent de conclure que, d'une part, comme il fallait s'y attendre, le foie joue un rôle efficace dans la détoxification de la benzidine et que, d'autre part, la bile semble drainer des quantités importantes du toxique ou de ses métabolites, ce qui expliquerait les fortes concentrations de dérivés diazotables que nous avons trouvées au niveau du tube digestif et, en particulier, de l'intestin au cours de l'étude de la répartition du toxique dans l'organisme.

B) ESSAIS « IN VITRO » AVEC DES HOMOGENATS DE FOIE

Nous ne reviendrons pas sur le mode de préparation des homogénats que nous avons exposé dans le troisième chapitre de la IV^e partie.

Ces homogénats étaient alors soumis à une incubation à 38° en présence de benzidine, puis chromatographiés.

1. INCUBATION :

Nous avons pratiqué cette incubation dans des fioles de Warburg, maintenues et soumises à l'agitation à une température de 38° pendant 3 heures et contenant 2 ml d'homogénat de foie au 1/5 en présence de dichlorhydrate de benzidine en solution dans du soluté isotonique.

Les quantités de ce sel étaient respectivement de 100, 250 et 500 µg, dans chacune de nos expériences. Nous avons parallèlement

effectué des essais « témoins » avec des homogénats incubés dans les mêmes conditions mais sans benzidine.

2. CHROMATOGRAPHIE :

Les homogénats furent aussitôt soumis à la chromatographie sur papier selon la technique indiquée au chapitre précédent. Après révélation par la p. diméthylaminobenzaldéhyde, les chromatogrammes d'homogénats de foie contenant le dichlorhydrate de benzidine ont accusé la présence de traces des dérivés *mono* et *diacétylés* ; en revanche, il ne nous a pas été possible de mettre en évidence la base libre.

II. — ÉTUDE DE L'ÉLIMINATION URINAIRE

A) ÉLIMINATION URINAIRE DE LA BENZIDINE CHEZ LE CHIEN

Un chien mâle d'un poids de 6 kg a reçu au total, par voie buccale, 4 g de benzidine base sous forme de cachets en l'espace de trois jours. L'élimination urinaire a été suivie pendant sept jours après la dernière absorption.

Les concentrations de formes diazotables dans l'urine étaient si élevées que nous avons pu effectuer les dosages directement sur des dilutions telles qu'aucune coloration parasite, due en particulier à la couleur initiale de l'urine, ne pouvait gêner ou fausser les lectures au photomètre. Ainsi, nous avons pu évaluer, sans aucune perte, la totalité des groupements diazotables libres (exprimés en benzidine). La détermination des formes conjuguées a été aussi effectuée sur des dilutions d'urines, soumises au préalable à l'hydrolyse, par ébullition à 80° en milieu chlorhydrique.

Le *tableau XVI* rassemble, exprimés en benzidine libre et en benzidine conjuguée, les chiffres que nous avons obtenus au cours de notre expérimentation chez le Chien. Sur ce même tableau, nous avons fait figurer les résultats des dosages d'acide glucuronique effectués selon la méthode de FISHMAN et coll. [67].

Nous avons jugé utile de présenter simultanément une reproduction du chromatogramme des urines précédentes (*fig. 4*).

La juxtaposition de ces résultats quantitatifs et qualitatifs nous permet quelques commentaires :

1° Si nous considérons tout d'abord les résultats consignés dans le *tableau XVI*, nous constatons qu'après une période de rétention

TABLEAU XVI

ÉLIMINATION URINAIRE DE LA BENZIDINE LIBRE ET CONJUGUÉE CHEZ LE CHIEN
AU COURS DE L'INTOXICATION SUBAIGUE

(4 absorptions de 1 g de benzidine sous forme de cachets)

DATE	PRISE BUCCALE	VOLUME URINE ÉLIMINÉ EN ml	BENZIDINE ÉLIMINÉE (en $\mu\text{g/ml}$)		ACIDE GLUCURONIQUE (en $\mu\text{g/ml}$)
			Libre	Libre + conjuguée	
1 ^{er} jour	0	160	0	0	62
2 ^e	2 g } 1 g matin 1 g soir	175 (avant 1 ^{re} prise de 1 g)	0	0	78
3 ^e	1 g	16	150	165	92
4 ^e	1 g	189	900	1.050	600
5 ^e	0	186	1.365	1.575	320
6 ^e	0	132	860	1.275	250
7 ^e	0	164	170	250	150
8 ^e	0	186	60	80	92,5
9 ^e	0	100	56	90	34
10 ^e	0	148	traces	12	120
11 ^e	0	160	traces	10	84

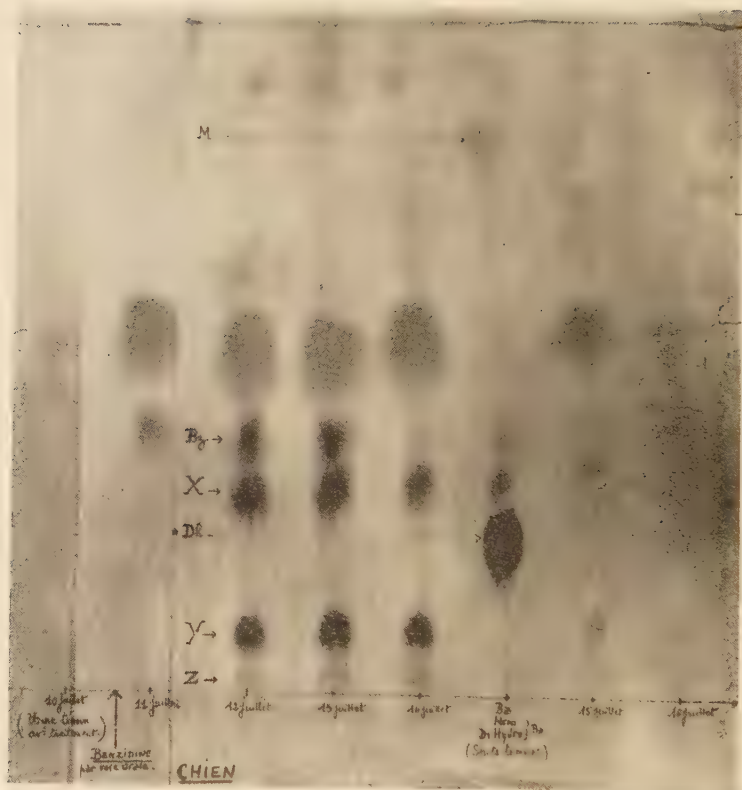


FIGURE 4

urinaire qui a duré près de 36 heures, à la suite de l'absorption de 2 g de benzidine, nous trouvons dans l'urine des groupements aminés aromatiques diazotables, sous forme libre ou conjuguée. Nous pouvons noter que les formes conjuguées sont en assez faible quantité par rapport à la base libre.

Quant à l'acide glucuronique, bien que sa teneur ne semble pas toujours proportionnelle aux quantités de benzidine éliminées, il n'en accuse pas moins une très nette augmentation, ce qui laisse à penser que la base pourrait s'éliminer, au moins partiellement, sous forme de conjugué glucuronique *facilement hydrolysable*.

D'autre part, il faut remarquer que les groupements aminés aromatiques et même conjugués disparaissent relativement vite de l'urine : 7 jours seulement après l'administration de la dernière dose, nous ne retrouvons plus que des traces d'amine libre et très peu de formes conjuguées. Mais si, tenant compte du volume d'urine éliminé chaque jour pendant cette période, on calcule la quantité totale de base libre et combinée rejetée par le rein, on s'aperçoit qu'il ne s'agit, en réalité, que du 1/5 environ de la benzidine libre absorbée. Nous pensons que la plus grande partie de l'amine se trouve éliminée avec les matières fécales, par l'intermédiaire de la bile, comme nous avons pu le mettre en évidence chez le Rat et le Cobaye.

2° Si l'on observe maintenant la *figure 4*, plusieurs constatations s'imposent :

- a) Comme BRADSHAW et CLAYSON, nous nous trouvons en présence de trois « spots » principaux (Bz, X, Y), parmi lesquels se trouve la *benzidine libre* (Bz).
- b) Contrairement à l'opinion émise par ENGELBERTZ et BABEL, il n'y a pas de dérivé mono (M) ou *diacétylé* (*) ; cette constatation cadre d'ailleurs avec le fait bien connu que le Chien est pratiquement incapable d'acétyler les groupes aminés aromatiques [166].
- c) Les formes diazotables comprennent, dès le premier jour, et jusqu'à la fin de l'élimination, de la benzidine libre (Bz).
- d) A côté de la benzidine libre ($R_f = 0,40$) (**) existent des dérivés colorés en rouge orangé par le réactif à la p. diméthyl-

(*) Le dérivé *diacétylé* ne figure pas sur le chromatogramme mais nous savons, pour l'avoir chromatographié au cours d'autres essais, que son « spot » se trouve très près de la ligne de front du solvant, ce qui lui confère un R_f voisin de 0,99.

(**) Les valeurs des R_f que nous rapportons sont celles obtenues dans les conditions de nos expériences.

aminobenzaldéhyde (X et Y), donc possédant vraisemblablement les deux groupements aminés libres de la benzidine mais ayant un R_f nettement différent ($X = 0,31$; $Y = 0,10$). On trouve aussi un « spot » coloré en jaune, que nous avons désigné par Z et dont le R_f est de 0,03.

Nous remarquerons, et ceci nous semble extrêmement important, que le « spot » du métabolite désigné par X sur notre planche correspond à celui d'une « impureté » de la dihydroxy-3, 3' benzidine que nous avons dénommée (Dh) (R_f : 0,23). Au cours de nos essais témoins, mettant en jeu la dihydroxy-3, 3' benzidine, nous avons toujours retrouvé cette impureté dont le R_f (0,31) est compris entre celui de la benzidine base et celui du dérivé dihydroxylé. On peut donc penser qu'il s'agit d'un dérivé *monohydroxylé* de la benzidine comme l'ont découvert BRADSHAW et CLAYSON, ou d'un dihydroxy-X, X' diamino-4, 4' biphényle ainsi que l'a suggéré BAKER. En tout cas, il ne s'agit pas du dihydroxy-3, 3' diamino-4, 4' biphényle trouvé par cet auteur dans les urines d'ouvriers, et, sur ce point, nous sommes en accord avec ENGELBERTZ et BABEL.

Nous avons essayé de déterminer la nature de ces « spots » inconnus par comparaison avec des « spots » de substances supposées être des métabolites possibles de la benzidine.

C'est ainsi que nous avons réalisé, dans les mêmes conditions, des chromatographies respectivement avec l'*amino-4 biphényle*, l'*hydroxy-3 amino-4 biphényle* et le *sel de potassium du conjugué disulfamique de la benzidine* que le Professeur BOYLAND, du « Chester Beatty Research Institute » de Londres, nous a transmis et auquel nous sommes heureux de dire ici notre gratitude.



Amino-4 biphényle



Hydroxy-3 amino-4 biphényle



Conjugué disulfamique de la benzidine
(sel de potassium)

Malheureusement, les « spots » obtenus avec ces trois produits ont présenté des R_f différents de ceux des « spots » X, Y et Z de nos chromatogrammes.

Toujours dans le but d'identifier les métabolites (et éventuellement de les séparer et de les isoler), nous avons soumis les urines à différents traitements avant de les chromatographier de nouveau.

C'est ainsi que nous avons pu constater :

- qu'une *double extraction par la butanone* à pH très alcalin, n'enlevait pas de la phase aqueuse le métabolite désigné par le spot Y. En revanche, la substance correspondant au spot X était partiellement extraite par la butanone ; *
- qu'une *hydrolyse* par ClH au 1/10, à 90°, pendant deux heures, ne modifiait ni le nombre, ni le Rf des spots précédemment découverts ;
- qu'au cours de l'*électrodialyse*, tous les métabolites, y compris la benzidine base, migraient, rapidement et en totalité, dans le compartiment cathodique sans modification apparente de leur structure ; en effet, le chromatogramme du liquide cathodique, par ailleurs *très alcalin*, était identique à celui de l'urine initiale.

Cette électrodialyse nous a permis, en traitant par l'éther le résidu d'évaporation à douce température du liquide cathodique, d'extraire, puis d'isoler à l'état cristallisé, la *benzidine base* que nous avons caractérisée par son point de fusion (128,5°).

La partie insoluble dans l'éther contient les métabolites X et Y dont nous n'avons pu, jusqu'ici, établir la structure définitive.

B) ELIMINATION URINAIRE DE LA BENZIDINE CHEZ LE LAPIN

Un lapin mâle, pesant 2,500 kg, a reçu quotidiennement, pendant 3 jours, 100 mg de benzidine base en solution dans le propylène-glycol, par voie intrapéritonéale. L'élimination urinaire a été suivie pendant quatre jours après la dernière absorption.

Nous avons effectué les dosages en suivant la même technique que pour l'étude de l'élimination urinaire chez le Chien.

Nos résultats sont consignés dans le *tableau XVII* et sur la *figure 5* que nous avons volontairement placée à ses côtés.

Contrairement à ce qui a été observé chez le Chien, on ne retrouve que peu de *benzidine libre*, mais, en revanche, les dérivés *monacétylés* (M) et *diacétylés* (Da) de l'amine se rencontrent en quantités extrêmement importantes, comme l'indiquent les résultats quantitatifs exprimant la benzidine conjuguée. Nous rappellerons qu'ENGELBERTZ et BABEL ont mis également en évidence des dérivés acétylés chez le Lapin ; mais, si nous confirmons l'expérimentation de ces auteurs, sur



FIGURE 5

TABEAU XVII

ELIMINATION URINAIRE DE LA BENZIDINE LIBRE ET CONJUGUÉE
CHEZ LE LAPIN AU COURS DE L'INTOXICATION SUBAIGUE

(3 injections d'une solution de benzidine dans le propylène-glycol à 20 mg/ml)

DATE	VOLUME INJECTÉ (en ml)	VOLUME URINE ÉLIMINÉ (en ml)	BENZIDINE ÉLIMINÉE (en µg/ml)		
			Libre	+ Libre conjuguée	Conjuguée
1 ^{er} jour	5	45 (avant injection)	0	0	0
2 ^e "	5	57	190	1.040	850
3 ^e "	5	60	71	1.020	949
4 ^e "	0	40	64	240	176
5 ^e "	0	52	52	60	8
6 ^e "	0	70	46	60	14
7 ^e "	0	50	11	12	—

ce point, nous devons dire que nous n'avons pas pu caractériser l'amino-4 hydroxy-4' biphényle.

Nous avons désigné par H un spot à peine visible sur notre reproduction et qui se trouve mêlé au spot de l'urée, uniquement dans les tout premiers jours de l'intoxication. Nous n'avons d'ailleurs pas pu identifier la substance correspondant à ce spot H.

C) FORMES D'ELIMINATION URINAIRE DE LA BENZIDINE
CHEZ LE RAT

L'examen chromatographique d'urines de rats intoxiqués par la benzidine, d'une façon subaiguë ou chronique, nous a permis de mettre en évidence, à côté de la *benzidine libre*, des dérivés acétylés avec une nette prédominance du dérivé *monoacétylé*, surtout chez l'animal intoxiqué chroniquement « per os ».

Nous avons également étudié l'intoxication aiguë (100 mg/kg). Dans ce cas, il apparaît, à l'état de traces et concurremment aux deux métabolites précédents, le dérivé que nous avons désigné par la lettre X dans la fig. n° 4 et qui constitue une impureté de la dihydroxy-3, 3' benzidine.

D) FORMES D'ELIMINATION URINAIRE DE LA BENZIDINE
CHEZ LE COBAYE

Les résultats obtenus à partir des urines de cobayes intoxiqués par la benzidine sont comparables à ceux rencontrés chez le Lapin.

La présence exclusive de *dérivés acétylés* dans les urines est en relation directe avec les résultats que nous avons obtenus au cours de la chromatographie des extraits de foie ou de bile du même animal.

A la fin de ce chapitre et de cette cinquième et dernière partie concernant l'étude des formes d'élimination de la benzidine en liaison avec leur pouvoir cancérigène, une conclusion s'impose : *seul le Chien* présente un métabolisme particulier différent de celui des autres espèces animales. Or, nous avons vu que le cancer de la vessie n'avait pu être reproduit expérimentalement que chez cet animal (travaux de SPITZ, MAGUIGAN et DOBRINER).

Nous pensons donc qu'il est nécessaire, d'une part, de continuer à rechercher la structure exacte des métabolites que nous avons découverts dans l'urine, d'autre part, de poursuivre l'étude du métabolisme de la benzidine chez le Chien afin de saisir de probables « *formes intermédiaires* » peut-être de nature quinonique, comme l'ont suggéré ENGELBERTZ et BABEL, mais qui ont échappé jusqu'ici aux recherches.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Après avoir rappelé, dans notre introduction, le rôle de certaines amines aromatiques (β -naphtylamine, xénylamine, benzidine) dans l'étiologie des *cancers vésicaux*, nous avons étudié, sur le double plan analytique et biologique, la toxicologie de la benzidine.

Notre étude n'avait pas spécialement pour but de provoquer expérimentalement l'apparition de tumeurs vésicales, qui nécessite un temps de latence très prolongé, mais d'obtenir, en utilisant les moyens classiques de la toxicologie, des données susceptibles d'éclairer les modalités d'action de la benzidine.

Notre travail comporte cinq parties.

- Dans la *première partie*, nous avons fait le point de nos connaissances actuelles concernant la benzidine. Nous avons rappelé son rôle important dans l'industrie des matières colorantes, puis nous avons successivement exposé sa préparation, ses principales propriétés, physiques, chimiques et biologiques, avant de nous arrêter plus longuement sur ses *effets toxiques*, sur l'étiologie des intoxications et sur leur prévention.

De cette mise au point, il ressort :

- 1° Que l'effet toxique prépondérant est l'*action cancérogène* se manifestant électivement au niveau de l'*épithélium vésical*, mais aussi, parfois, chez l'Animal, au niveau d'autres organes (foie, conduit auditif, gros intestin).

Cette action cancérogène vésicale a été mise en évidence par de nombreuses observations cliniques chez l'Homme, mais elle s'est révélée difficilement reproductible chez l'Animal ; seul de toutes les espèces, le *Chien* paraît vraiment sensible au pouvoir cancérogène de l'amine, au moins dans les conditions expérimentales classiques.

- 2° Que les cancers vésicaux n'apparaissent qu'après un très long *temps de latence* pouvant atteindre plusieurs dizaines d'années chez l'Homme, ce qui explique les difficultés rencontrées pour reproduire expérimentalement le cancer chez les différentes espèces animales.
- 3° Que, à côté des effets cancérigènes à très long terme, peuvent se manifester plus précocement des effets toxiques, et, en particulier, des phénomènes *d'irritation de la peau* consécutifs à des contacts répétés avec l'amine.
- 4° Que, au stade industriel de sa *fabrication* ou lors de ses emplois, la benzidine peut pénétrer dans l'organisme, soit par la voie *cutanée*, soit par la voie pulmonaire.
- 5° Que, du point de vue prophylactique, toutes dispositions doivent être prises pour effectuer la préparation ou la manipulation de la base dans des récipients clos. De plus, sur le plan médical, la pratique régulière *d'examen cystoscopiques*, chez les sujets exposés, est vivement conseillée car elle permet un dépistage rapide des tumeurs *à leur début*, condition essentielle à la mise en œuvre d'une prévention et d'un traitement efficaces.

• Dans la *deuxième partie*, après avoir effectué l'étude critique des méthodes déjà proposées pour le dosage ou l'isolement de la benzidine dans les différents milieux, nous avons exposé la méthode personnelle que nous avons établie pour le dosage de cette amine. Cette méthode est basée sur la réaction de MARSHALL : diazotation, suivie d'une copulation avec le chlorhydrate de N- α -naphtyl-diéthyl-propylène-diamine. Dans ces conditions, et en présence de méthyl-éthylcétone (ou butanone), la benzidine donne une coloration bleue qui se prête à un dosage colorimétrique.

Nous avons précisé les conditions d'application de cette méthode au dosage de l'amine dans les atmosphères et les milieux biologiques.

- Dans le cas des *atmosphères*, la benzidine est captée dans la butanone.
- Dans le cas des *milieux biologiques*, l'amine est extraite par la butanone, à pH alcalin ; lorsqu'il s'agit d'organes, ceux-ci sont au préalable triturés au mortier en présence de sable avant d'être soumis à l'extraction.

Cette méthode n'est malheureusement pas rigoureusement spécifique de la benzidine, mais elle est facile à mettre en œuvre, rapide, sensible et, de plus, la coloration bleue obtenue est très stable.

• Disposant de cette méthode de dosage, nous avons étudié, dans la *troisième partie* de notre travail, la répartition du toxique, au niveau des principaux organes, chez différentes espèces animales (Lapin, Rat, Cobaye), soumises à des intoxications expérimentales aiguës, subaiguës et chroniques.

Nous avons, de plus, tenté de localiser le toxique au niveau des structures cellulaires (noyaux, mitochondries et microsomes) du tissu hépatique.

Les faits les plus saillants, mis en évidence au cours de cette étude analytique, sont les suivants :

- 1° La benzidine s'éliminant, soit sous forme *libre*, soit sous forme *conjuguée*, se localise essentiellement, chez toutes les espèces, au niveau du *foie* et du *rein*.
- 2° La benzidine, administrée par voie parentérale, se retrouve en grande partie au niveau du *tube digestif*, ce qui laisse à penser (ce que nous avons d'ailleurs confirmé par chromatographie) que la *bile* joue un rôle important dans l'élimination du toxique.
- 3° Chez le Rat, il existe, à la suite de l'intoxication aiguë, une localisation *cérébrale* importante pouvant expliquer les troubles d'ordre nerveux que nous avons constatés.
- 4° La fixation *surrénalienne* est importante chez le Rat et le Cobaye, pratiquement nulle chez le Lapin.
- 5° Contrairement à notre attente, les parois vésicales ne semblent pas fixer électivement la benzidine ou ses produits de transformation, quelles que soient les conditions d'intoxication.
- 6° Chez le Cobaye, les formes conjuguées prédominent nettement sur la forme libre.

• Dans la *quatrième partie*, nous avons étudié un certain nombre d'effets de la benzidine au niveau de différents récepteurs.

Nous avons tout d'abord examiné, dans un premier chapitre, les effets sur le sang et nous avons constaté que, au cours de l'intoxication chronique chez le Lapin et chez le Rat, la benzidine provoquait *peu de variations hématologiques*. C'est ainsi que, en particulier, la recherche des « corpuscules de Heinz » ne s'est révélée positive qu'exceptionnellement.

Le deuxième chapitre a été consacré à l'étude de l'action de la benzidine sur le *pigment sanguin* : une action méthémoglobinisante ne

s'est manifestée que chez le Rat, et seulement au cours de l'intoxication aiguë.

Dans un troisième chapitre, nous avons exposé les résultats que nous avons obtenus en étudiant l'action de la benzidine sur la *respiration cellulaire* par la méthode manométrique de Warburg. Seules des concentrations relativement élevées inhibent la respiration des tissus *hépatique* et *cérébral* du Rat.

Enfin, dans un quatrième chapitre, nous avons rapporté les observations faites au cours de l'*examen histologique* de différents organes prélevés sur des animaux (Rat, Lapin, Chien) soumis à l'intoxication chronique par la benzidine. L'organe le plus atteint semble être le *rein* qui accuse une *néphrite subaiguë chronique*, avec présence de *cylindres hématuriques*, chez le Lapin et le Rat, et une *glomérulonéphrite épithéliale*, accompagnée de *nécrose massive*, chez le Chien. En aucun cas, dans les conditions de notre expérimentation, nous n'avons observé de lésions précancéreuses particulièrement au niveau de la vessie.

• La cinquième et dernière partie a été consacrée à l'étude qualitative et quantitative du *métabolisme* de la benzidine chez les différentes espèces animales.

Dans un premier chapitre, nous avons rappelé les travaux déjà effectués par différents auteurs, tant sur le plan analytique que sur le plan biologique, pour tenter de découvrir un rapport entre le pouvoir cancérigène et les produits de transformation de l'amine dans l'organisme.

Puis nous avons exposé en détail, dans le deuxième chapitre, la *technique chromatographique* que nous avons utilisée pour l'étude de ce métabolisme.

Enfin, dans le troisième chapitre, nous avons consigné les résultats de nos recherches des métabolites, d'une part, au niveau du *tissu hépatique*, en opérant soit « *in vivo* », soit « *in vitro* », d'autre part, et surtout, dans l'*urine* d'animaux intoxiqués.

C'est ainsi que nous avons pu mettre en évidence :

A) AU NIVEAU DU TISSU HÉPATIQUE

1) « *In vivo* » :

Chez le Rat, le Cobaye et le Lapin, la présence, à côté de la base libre, de dérivés mono et diacétylés que nous avons d'ailleurs retrouvés dans la *bile*.

2) « *In vitro* » :

Après incubation à 37° en présence de dichlorhydrate de benzidine, des traces de dérivés acétylés.

B) DANS L'URINE

1) *Chez le Chien* :

— La présence, révélée par leurs spots, de trois métabolites *principaux*, parmi lesquels nous avons identifié la *benzidine base* et un dérivé peut-être hydroxylé mais qui n'est pas, comme l'a prétendu BAKER, le dihydroxy-3, 3' diamino-4, 4' biphényle.

La nature du troisième métabolite n'a pas encore été déterminée.

— L'absence de formes d'élimination acétylées, ce qui est en contradiction avec les résultats obtenus par ENGELBERTZ et BABEL mais cadre avec les données classiques concernant les aptitudes métaboliques de cet animal.

2) *Chez le Rat* :

— La présence, dans tous les cas d'intoxication, de la *base* et des dérivés *mono* et *diacétylés* et, seulement au cours de l'intoxication aiguë, l'apparition du dérivé, découvert chez le Chien dont la structure n'a pas encore pu être établie de façon précise mais dont nous avons des raisons de penser qu'il s'agit d'un composé monohydroxylé.

3) *Chez le Lapin et le Cobaye* :

— La présence des deux formes acétylées de la base, à l'exclusion des formes hydroxylées.

Ces constatations sont intéressantes à mettre en parallèle avec les différences de réceptivité des diverses espèces animales au cancer de la vessie.

Nous rappellerons, en effet, pour conclure que le Chien, chez lequel nous avons pu mettre en évidence un métabolisme du toxique nettement différent de celui rencontré chez les autres espèces étudiées, s'est révélé jusqu'ici, à la suite des travaux de SPITZ, MAGUIGAN et DOBRINER, le seul animal sensible à l'action cancérogène vésicale de la benzidine, au moins après administration « *per os* ».

Aussi, malgré les difficultés de l'expérimentation, nous semble-t-il nécessaire d'orienter plus spécialement de nouvelles recherches vers une étude plus vaste et encore plus approfondie du métabolisme de la benzidine chez cet animal.

Vu le 4 mars 1958
le Doyen de la Faculté de Pharmacie
R. FABRE

Vu pour permis d'imprimer
Paris le 8 mars 1958
Le Recteur de l'Académie de Paris
J. SARRAILH

BIBLIOGRAPHIE

1. ABOULKER (P.) et SMAGGHE (G.). — Tumeurs de la vessie des ouvriers des matières colorantes (21 observations). Intérêt du dépistage systématique et du choix des méthodes. (*Arch. Mal. Prof.*, 1953, **14**, 380-386.)
2. ABOULKER (P.), GAULTIER (M.), BENGUIGUI (M.) et SMAGGHE (G.). — Quatre cas nouveaux d'amino-tumeurs de la vessie. (*Arch. Mal. Prof.*, 1949, **10**, 370-371.)
3. ADAMS (R.), BULLOCK (J.E.) et WILSON (W.C.). — Contribution to the structure of Benzidine. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1923, **45**, 521-527.)
4. ADLER (O.). — Die Wirkung und des Schicksal des Benzidins im Tierkörper. (*Arch. Exp. Pathol. Pharm.*, 1908, **58**, 167-197.)
5. ANDERSON (W.A.D.). — Pathology. (III^e édition. Edit. by the C.V. Mosby Company, 1957, 599-610.)
6. ARDASHEV (B.I.) et BYSH (E.S.). — Acetylation of aromatic amines by acetylchloride with sodium acetate. (*J. Gen. Chem. (USSR)*, 1951, **21**, 1503-1505.)
7. BACKER (H.J.) et BLOEMEN (A.). — β sulfobutyric acid. (*Rec. Trav. Chim.*, 1926, **45**, 100-109.)
8. BAECHLER (L.). — Über den Blutnachweis mit Benzidin. (*Schweiz. Apoth. Ztg*, 1925, **63**, 5-7.)
9. BAER (R.L.). — Benzidin as cause of occupational dermatitis in a physician. (*J. Am. Med. Assoc.*, 1945, **129**, 442-443.)
10. BAKER (K.). — The carcinogenic activity of Dihydroxybenzidine. (*Acta unio Intern. contra cancerum*, 1950, **7**, 46-51.)
11. BAKER (K.) et DEIGHTON (G.). — The Metabolism of benzidin in the Rat. (*Cancer Research*, 1953, **13**, 529-531.)
12. BALAS (F.) et SEVCENKO (P.). — Catalytic reduction of Benzidine. (*Collection, Czechoslov. Chem. Comm.*, 1931, **3**, 171-176.)
13. BALDEON (E.R.). — Reactivo sulfo-Barico para algunos productos orgánicos. (*Per facultad. farm. y bioquim.*, Univ. nacl. mayor San Marcos, 1949, **10**, 146-155.)

14. BAMBERGER (E.) et LAGUTT (J.). — Ueber das Verhalten des Phenylhydroxylamins gegen alkoholische Schwefelsäure und gegen Anilin. (*Ber.*, 1898, **31**, 1.500-1.508.)
15. BARSOTTI (M.) et VIGLIANI (E.C.). — Bladder lesions from aromatic amines. Statistical considerations and preventive measures. (Proc. 9th Intern. Congr. Ind. Med., London, 1948, pp. 484-488. Cf. également : *Med. Lavoro*, 1949, **40**, 129-138.)
16. BELLESINI (C.). — Industrial production of benzidine and absence of tumours. (Proc. 9th Intern. Congr. Ind. Med., London, 1948, pp. 488-490. Cf. également : *Arch. Mal. Prof.*, 1949, **10**, 87.)
17. BERENBLUM (I.) et BONSER (G.M.). — Experimental investigation of « aniline cancer ». (*J. Indust. Hyg. and Toxicol.*, 1937, **19**, 86-92.)
18. BERISSO (B.). — Benzidine hydrochloride as a reagent for permanganate, chromate and dichromate ions. (*Pubs inst. invest. microquim. Univ. nacl. litoral* (Rosario, Argentina), 1944, **8**, 35-37.)
19. BERLINGOZZI (S.) et TURCO (A.). — Quinoline-4-carboxylic acid. (*Ann. Chim. Applicata*, 1927, **17**, 244-249.)
20. BEZSSONOFF (N.) et LEROV (H.). — Action peroxydasique de la vitamine C sur les crésols, la tyrosine, la benzidine, « in vitro ». (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1946, **28**, pp. 294-300; *C.R.*, 1945, **220**, 709-711.)
21. BILLIARD-DUCHESNE (J.L.). — Les amino-tumeurs de la vessie. (Tumeurs dites aniliniques). Dix-sept observations françaises. (*J. Urol.*, 1947, **53**, 401-423.)
Cf. également : Les amino-tumeurs de la vessie. Notes d'étiologie et de prophylaxie. (*Arch. Mal. Prof.*, 1948, **9**, 109-116.)
22. BING (F.C.). — Purification of benzidine and improved reagent for estimating hemoglobin in blood. (*J. Biol. Chem.*, 1932, **95**, 387-388.)
23. BISSON (C.S.) et CRISTIE (A.W.). — Solubility of benzidine sulfate in water. (*J. Ind. Eng. Chem.*, 1920, **12**, 485-486.)
24. BLUM (M.P.) et SMAGGHE (G.). — Symposium sur les dermatoses professionnelles. Lille (10-11 juin 1955.) A propos de quelques cas de dermites observés dans la fabrication des matières colorantes. (*Arch. Mal. Prof.*, 1955, **16**, 110-111.)
25. BONSER (G.M.). — Epithelial tumours of bladder in dogs induced by pure β -naphthylamine. (*J. Path. and Bact.*, 1943, **55**, 1-6.)
26. BONSER (G.M.). — Experimental cancer of the bladder. (In « *British Empire Cancer Campaign. Annual Report* », 26. London, 139-141.)
27. BONSER (G.M.), CLAYSON (D.B.), JULL (J.W.) et PYRATH (L.N.). — The carcinogenic properties of 2-amino-1 naphthol hydrochloride and

- its parent amine 2 naphthylamine. (*Brit. J. Cancer*, 1952, 6, 412-424.)
28. BOOTH (J.), BOYLAND (E.) et MANSON (D.). — Metabolism of Polycyclic Compounds-Metabolism of 2-Naphthylamine in Rat Tissue Slices. (*Biochem. J.*, 1955, 60, 62-71.)
 29. BOYLAND (E.), WALLACE (D.M.) et WILLIAMS (D.C.). — The activity of the enzymes sulphatase and β -glucuronidase in the urine, serum and bladder tissue. (*Brit. J. Cancer*, 1955, 9, 62-79.)
 30. BRADSHAW (L.) et CLAYSON (D.B.). — Metabolism of two aromatic amines in the Dog. (*Nature*, 1955, 176, 974-975.)
 31. BRASS (K.) et PAPP (O.). — Benzidino-chinone und Bis-chinonylbenzidine als Küpenfarbstoffe. (*Ber.*, 1920, 53, 446-462.)
 32. BUEHLER (C.A.) et HEAP (A.G.). — Molecular organic compounds. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1926, 48, 3.168-3.172.)
 33. BUTT (L.T.) et STRAFFORD (N.). — Papilloma of the bladder in the chemical Industry. Analytical methods for the determination of benzidine and β -Naphthylamine, recommended by A.B.C.M. subcommittee. (*J. Appl. Chem.*, 1956, 6, 525-539.)
 34. BYKHOVSKAYA (M.S.). — Colorimetric determination of vapors of nitrobenzene, azobenzene, aniline and benzidine in atmospheres. (*Org. Chem. Ind. (USSR)*, 1939, 6, 638-639.)
 35. CANDEA (C.), DOBRESCU (F.) et CROPSIANU (Z.). — Résistance à l'oxydation des pétroles roumains et effet des antioxydants sur le « nombre d'oxydation ». (Article en français). (*Bull. Inst. Nat. Cercetaria Technol.*, 1947, 2, 98-109; in *C.A. (*)*, 1948, 42, 9137h.)
 36. CASE (R.A.M.) et PEARSON (J.T.). — The locally carcinogenic effects of impurities in β -naphthylamine. (*C.R., II^e Congrès Inter. Biochimie*, Paris, 1952, p. 464.)
 37. CHAUCHEAU (J.). — Nouvelle méthode d'isolement des noyaux cellulaires. (*C.R.*, 1952, 235, 902-904.)
 38. CHAUCHEAU (J.) et CLEMENT (G.). — Méthode d'obtention quantitative des structures cellulaires à partir d'un même échantillon de tissu. (*Arch. Sci. Physiol.*, 1951, 5, 277-288.)
 39. CHWAT (S.). — Patogeneza i zwalczanie zawodowego raka pęcherza moczowego. (*Medycyna Pracy*, 1957, 3, 159-180.)
 40. CHWAT (S.) et ADER (D.). — Oznaczanie benzydyny i jej pochodnych w moczu. (*Medycyna Pracy*, 1956, 2, 15-24.)
 41. CLAUDE (A.). — Constitution of mitochondria and microsomes and the distribution of nucleic in the cytoplasm of a leukemic cell. (*J. Exper. Med.*, 1944, 80, 19-29.)

(*) « Chemical Abstracts ».

42. CLEMMESSEN (J.), NIELSEN (A.) et LOCKWOOD (K.). — Mortality rates for cancer of urinary bladder in various countries. (*Brit. J. Cancer*, 1957, *11*, 1-7.)
43. DANNEBERG (P.) et SCHMALL (D.). — Estrus, inhibiting substances (*Z. Naturforsch.*, 1952, *7b*, 468-475; in *C.A.*, 1953, *47*, 3478e.)
44. DEROBERT (L.) et HAUSER (G.). — *La pratique médico-légale*, p. 17. (Ed. Doin et Cie, 8 place de l'Odéon, Paris 6^e.)
45. DESOILLE (H.). — Cité par ABOULKER et SMAGGHE (1).
Cf. également : DESOILLE (H.), HOCHFELD (M.) et ABOULKER (P.). Le dépistage des tumeurs vésicales chez les ouvriers des matières colorantes. Premiers résultats de cystoscopie systématique. (*Arch. Mal. Prof. de Méd. Trav. et de Sécur. Soc.*, 1948, 1-3.)
46. DEY (B.B.), GOVINDACHAR (T.R.) et RAJAGOPALAN (S.C.). — Electrolytic reduction of nitro-compounds. The electrolytic reduction of nitro-benzene. The electrolytic production of Benzidine. (*J. Sci. E. Ind. Research*, 1946, *4*, 559-568.)
47. DIEKE (S.H.), ALLEN (G.S.) et RICHTER (C.P.). — The acute toxicity of thioureas and related compounds to wild and domestic Norway rats. (*J. Pharmacol.*, 1947, *90*, 260-270.)
48. DI MAIO (G.). — Aniline tumors of the bladder. (*Urologia*, 1936, n° 4; Cf. également *Urol. Cutaneous*, 1937, *41*, 280; in *C.A.*, 1937, *31*, 4009/8.)
49. DI MAIO (G.). — Affections of the bladder due to aromatic amines. (*Proc. 9th Intern. Congr. Ind. Med.*, London, 1948, 476-483.)
50. DOBRINER (K.), HOFMANN (K.) et RHOADS (C.P.). — The metabolism of Naphthylamine by rats, rabbits and monkeys. (*Science*, 1941, *93*, 600-601.)
51. DOUILLET (M.). — Cinq amino-tumeurs de la vessie. (*J. Urol. Méd. Chir.*, 1949, *55*, 376-378.)
52. DOX (A.W.). — The behavior of benzidine toward selenic and telluric acids. (*Proc. Iowa Acad. Sci.*, 1917, *24*, 537-538.)
53. DREYFUS (H.). — Acylated aromatic amines. (*U.S.P.*, May 5, 1936, 2.039, 305; in *C.A.*, 1936, *30*, 4176/4.)
54. DROBOT'KO (V.G.), AIZENMAN (B.E.), SHVAIGER (M.O.), FELDSTEIN (R.G.) et CHERNYSHEVA (P.S.). — Chemotherapy of brucellosis. (*Zhur. Mikrobiol., Epidemiol., Immunobiol.*, 1945, *7-8*, 69-74; in *C.A.*, 1946, *40*, 7396/3.)
55. DRUCKREY (H.) et KUPFMULLER (K.). — « Dosis und Wirkung. » (*Die Pharmazie*, 1949, *8*, 515-645, Ed. Cantor, Aubendorf, Wutbg.)
56. EDER (J.M.). — Lichtempfindlichkeit von Säure-Teerfarbstoffen mit Benzidin und deren photochemischen Eigenschaften. (*Sitzb. Akad. Wiss., Wien*, 1921, *130*, 329-331.)

57. EHRLICH (P.) et SHIGA (K.). — Farbertherapeutische versuche bei Trypanosomenerkrankung. (*Berl. Kl. Woch.*, 1904, 13, 329-332.)
58. EKMAN (B.). — Citrin and the metabolism of some indole and benzene compounds (in English). (*Kgl. Fysiograf. Sällskap. Lund. Förb.*, 1947, 17, 141-154.) Cf. également : EKMAN (B.) et STROMBECK (S.P.). — Demonstration of tumorigenic decomposition products of 2-3-azotoluene. (*Acta Physiol. Scand.*, 1947, 14, 43-49.)
59. ENGEL (H.J.). — Uber das Schicksal des Betanaphthythylamins im Organismus des Hundes. (*Zbl. Gewby.*, 1920, 8, 81-86.)
60. ENGELBERTZ (P.) et BABEL (E.). — Nachweis von Benzidin und seinen unwandlungsprodukten im harn und in organteilen. (*Zbl. Arbeits. Med.*, 1953, 3, 161-168.)
61. EVANS (E.E.). — Causative agents and protective measures in the aniline tumor of the bladder. (*J. Urol.*, 1937, 38, 212-215.)
62. FABRE (R.). — « Généralités sur les poisons. » (*Leçons de Toxicologie*, I, 77-78, Ed. Hermann et Cie, 6, rue de la Sorbonne, Paris, 1943.)
63. FABRE (R.). — « Dérivés aromatiques. » (*Leçons de Toxicologie*, 5, 66, Ed. Hermann et Cie, 6, rue de la Sorbonne, Paris, 1943.)
64. FABRE (R.), TRUHAUT (R.) et BOUDÈNE (Cl.). — Dosage de petites quantités de nicotine dans les atmosphères et les milieux biologiques animaux ou végétaux. Application à l'étude de l'absorption et de l'élimination de l'alcaloïde chez les sujets exposés. (*Ann. Pharm. Franç.*, 1952, 10, 579-594.)
65. FABRE (R.), TRUHAUT (R.), VERMES (E.) et BERNUCHON (J.). — Contribution à l'étude de la toxicologie des solvants de remplacement du benzène. (*Rapport présenté au Troisième Congrès National Technique de Sécurité et d'Hygiène du Travail*, Avignon (Vaucluse), 9-12 octobre 1957.)
66. FERRISS (C.V.) et TURNER (E.E.). — The condensation of aromatic amines with α and β diketones and with 4-4' diacetyl diphenyl. (*J. Chem. Soc.*, 1920, 117, 1140-1151.)
67. FISHMAN (W.H.), SMITH (M.), THOMPSON (D.B.), BONNER (C.D.), KASDON (S.C.) et HOMBURGER (F.). — Investigation of glucuronic acid metabolism in human subjects. (*J. Clin. Invest.*, 1951, 30, 685-696.)
68. FITTIG (R.). — Ueber einige derivate des phenyls. (*Ann.*, 1862, 124, 275-289.)
69. FOLIN (O.). — A new colorimetric method for the determination of the amino-acid nitrogen in blood. (*J. Biol. Chem.*, 1922, 51, 377-391.)
70. FURST (A.) et FREEDLANDER (B.L.). — The action of aminobiphenyl derivatives on the growth of mouse sarcoma and in chemotherapy of tuberculosis. (*Stanford Med. Bull.*, 1952, 10, 308-309.)

71. GAGE (J.C.). — 'Draft I.C.I. Method for the determination of Benzidine hydrochloride in the atmosphere. (Published by « Imperial Chemical Industries Limited », November 1955.)
72. GASPARIC (J.), PETRANEK (J.) et VECERA (M.). — Papierchromatographische Trennung und Identifizierung von Benzidin und seinen Isomeren. (*Mikrochim. Acta*, 1955, 56, 1026-1030.)
73. GAULTIER (M.), BENGUIGUI (M.) et SMAGGHE (G.). — A propos de 33 cas d'intoxications aiguës méthémoglobinisantes. (*Arch. Mal. Prof.*, 1949, 10, 368-370.)
74. GEHRMANN (G.H.), FOULGER (J.H.) et FLEMING (A.J.). — Occupational carcinoma of the bladder. (*Proc. 9th Intern. Congr. Ind. Med.*, London, 1948, 472-474.)
75. GLASMAN (J.M.) et MEIGS (J.W.). — Benzidine (4-4'-diaminobiphenyl) and substituted benzidines. (*A.M.A. Arch. Indust. Hyg. and Occup. Med.*, 1951, 4, 519-532.) Cf. également *A.M.A. Arch. Indust. Hyg. and Occup. Med.*, 1951, 4, 533-540.
76. GOLDBLATT (M.W.). — Vesical tumours induced by chemical compounds. (*Brit. J. Ind. Med.*, 1949, 6, 65-81.)
77. GUGLIAMELLI (L.), CHANUSSOT (P.) et RUIZ (C.L.). — Etude des produits de condensation des anhydrides de diacides avec certaines diamines aromatiques : I, Condensation de l'anhydride phtalique avec la Benzidine. (*Bull. Soc. Chim.*, 1932, 51, 80-90.)
78. GUTMAN (A.), KIELY (J.) et KLEIN (M.). — The metabolism of 2-amino fluorene in the rat. (*Cancer Research*, 1952, 12, 350-355.)
79. HAMILTON (A.). — Discussion of the etiology of so called aniline tumors of the bladder. (*J. Industr. Hyg.*, 1921, 3, 16-28.)
80. HARMAN (J.W.), MILLER (E.C.) et MILLER (J.A.). — Chronic glomerulonephritis and nephrotic syndrome induced in Rats by N.N' diacetylbenzidine. (*Am. J. Path.*, 1952, 28, 529-530.)
81. HENKEL (H.). — Ueber chronische Hautreizungen mit Anilin-Benzidin und crotonöl. (*Centr. Allgem. Path.*, 1924, 34, 553-556.)
82. HERZOG (W.). — New gravimetric determination of Benzidine and its homologs. Some new complex salts of these bases. (*Chem. Rundschau Mitteleuropa u. Balkan*, 1930, 7, n° 15, 17-19; in *C.A.*, 1931, 25, 2940.)
83. HIEBER (W.) et RIES (K.). — Uber die Konstitution der Metallsalzverbindungen mit p-Phenylendiamin und Benzidin. (*Z. Anorg. Allgem. Chem.*, 1929, 180, 105-109.)
84. HIRSCH (R.). — Ueber O-Methylbenzidin. (*Ber.*, 1890, 23, 3222-3226.)
85. HODGMAN (C.D.). — Handbook of Chemistry and Physics. 37th ed., 1955-1956, p. 776. (Published by « Chemical Rubber Publishing Co », Cleveland, Ohio.)

86. HODGSON (H.H.). — Chemistry of Benzidine. (*J. Soc. Dyers Colourists*, 1927, 43, 185-189; in *C.A.*, 1927, 21, 2800.)
87. HOFMANN (A.W.): — Sur l'hydrazobenzole, nouveau composé isomère de la benzidine. (*C.R.*, 1863, 56, 1110-1113.)
88. HOPPER (I.V.) et ALEXANDER (J.R.). — Monoacyl derivatives of benzidine. (*J. Roy. Tech. Coll.*, Glasgow, 1930, 2, 200-202.)
89. HUEPER (W.C.). — Panel on epidemiology, including environmental and occupational cancer. (*Proc. Nat. Cancer Conf.*, 1949, 244-258.)
90. HUEPER (W.C.), WILEY (F.H.) et WOLFE (H.D.). — Experimental production of bladder tumors in dogs by administration of β -naphthylamine. (*J. Ind. Hyg.*, 1938, 20, 46-84.)
91. HUGUENIN (R.). — Les cancers dits « professionnels ». (*Arch. Mal. Prof.*, 1941, 3, 97-128.)
92. IVANOVA (Z.V.) et KUL'BERG (L.M.). — New principles for distinguishing homologs, isomers and organic compounds of similar structure. (*Zhur. Anal. Khim.*, 1947, 2, 189-209; in *C.A.*, 1949, 43, 6944d.)
93. JIMENEZ (F.S.). — Adsorption in benzidine compounds from the analytical point of view. (*Rev. Acad. Cienc.*, Madrid, 1934, 31, 351-395; in *C.A.*, 1935, 29, 1749/1.)
94. JOIS (H.S.) et MANJUNATH (B.L.). — Molecular compounds of 4-6-dichloro-1-3-dinitrobenzene. (*J. Indian Chem. Soc.*, 1931, 8, 633-636.)
95. KAUFLEDER (F.). — Zur räumlichen Auffassung der mehrkernigen Verbindungen. (*Ann.*, 1907, 351, 151-160.)
96. KISHORE (B.M.) et SIKHIBHUSHAND (D.). — Photoreaction in tropical sunlight. (*Proc. Acad. Sci. United Provinces India*, 1935, 4, 319-329.)
97. KLEIN (B.). — Microdetermination of sulfate. A colorimetric estimation of the Benzidine sulfate precipitate. (*Ind. Engl. Chem. Anal. Ed.*, 1944, 16, 536-537.)
98. KLINGENBERG (K.). — Oxydation aromatischer Substanzen im tierischen Organismus. (*Diss.*, Rostock, 1891.) Cité par ENGELBERTZ et BABEL (60).
99. KOFLER (L.) et LINDPAINTNER (E.). — Mikroskopische untersuchungen und polymorphen substanzen. I, Benzil, Oxychinolin und Benzidin. (*Mikrochemie*, 1938, 24, 43-58.)
100. KOLTHOFF (I.M.). — Over Het Gebruik van Benzidine als Reagens en Tevens als Indication Voor een Bepaalde Oxydatic-Potentiaal. (*Chem. Weekblad*, 1924, 21, 2-4.)

101. KONDO (S.). — Effect of various aromatic substances on the blood vessels; a comparison of the constitution and action of drugs. (*Jap. Med. Literature*, 1919, 4, 18; in *C.A.*, 1919, 13, 1343.)
102. KONDO (H.) et ISHIDA (S.). — Condensation of benzidine with formaldehyd. (*Pharm. Soc. Japan*, 1922, 489, 979-985.)
103. KRETOV (A.E.). — Compound of oxygenated halogen acids with Benzidine. (*J. Russ. Phys. Chem. Soc.*, 1928, 60, 1427-1433.)
104. KUCHENBECKER (A.). — Über den Nachweis aromatischer Amidverbindungen im Harn über die Umwandlung aromatischer Amidverbindungen im Tierkörper. (*Zbl. Gew. Hyg.*, 1920, 8, 68-72.)
105. KUHN (R.), JACOB (P.) et FURTER (M.). — Über die Kondensation von aromatischen Diaminen mit Dicarbonsäureanhydriden. (*Ann.*, 1927, 455, 254-271.)
106. KUHN (R.) et ZUMSTEIN (F.). — Über die Dissoziations Konstanten aromatischer Diamine and über den räumlichen Bandes benzidins. (*Ber.*, 1926, 59, 488-498.)
107. KULBERG (L.M.). — The detection of Benzidine and Tolidine in the presence of each other. (*J. Gen. Chem.*, U.S.S.R., 1935, 5, 175-1756.)
108. LANGECKER (H.). — Beitrag zur Bestimmung aromatischer Amine. (*Biochem. Z.*, 1953, 324, 214-216.)
109. LE FEVRE (R.J.W.) et TURNER (E.E.). — Benzidine monohydrate, and notes on recorded melting points of Benzidine. (*J. Soc. Chem. Ind.*, 1927, 46, 209-210.)
110. LEVADITI (C.), GIRARD (A.) et VAISMAN (A.). — Action curative et antiendotoxique de certains dérivés benzéniques non soufrés dans la gonococcie et la méningococcie expérimentales. (*C.R. Soc. Biol.*, 1938, 128, 305-307.)
111. LOEB (W.). — Ueber die elektrolytische darstellung des benzidins. (*Ber.*, 1900, 33, 2329-2333.)
112. MADELUNG (W.). — Die theorie der Benzidin. Oxydation in ihrer Bedeutung für Peroxydase Untersuchungen. Bemerkungen zu der gleichnamigen Abhandlung von Fr^l. Gertrud Woker. (*Ber.*, 1917, 50, 105-111 et 1181-1187.)
113. MAGUIGAN (W.H.). — Cité par GLASSMAN (J.M.) et MEIGS (J.W.) (75).
114. MALOWAN (L.S.). — The reaction of hematin with benzidine in presence of inorganic salts. (*Ciencia, Mex.*, 1952, 12, 98; in *C.A.*, 1953, 47, 3381/1.)
115. MANSON (L.A.) et YOUNG (L.). — The metabolism of 2-naphtylamine and 2-acetamidonaphtalene. (*Bioch. J.*, 1950, 47, 170-175.)
116. MARSHALL (E.K.). — Determination of sulfanilamide in blood and urine. (*J. Biol. Chem.*, 1937, 122, 263-273.) Cf. également MARS-HALL (E.K.) et LITCHFIELD (J.J.). — Determination of sulfanil-

- amide. (*Science*, 1938, **88**, 85-86.) Cf. également BRATTON (A.C.) et MARSHALL (E.K.). — A new coupling component for sulfanilamide determination. (*J. Biol. Chem.*, 1939, **128**, 537-550.)
117. MASSON (P.). — Tumeurs humaines. Histologie, diagnostics et techniques, p. 636. (Edit. par Librairie Maloine, 27, rue de l'Ecole-de-Médecine, Paris, 1956.)
118. MATZDORF (G.). — Monoacetylbenzidin. (*D.R.P.*, 24 Feb. 1927; 523. 519.)
119. MAYER (R.L.). — Aromatic amines and azo-dyes in allergy and cancer. (*J. Invest. Dermat.*, 1948, **10**, 389-396.)
120. MEIGS (J.W.), BROWN (R.M.) et SCIARINI (L.J.). — A study of exposure to benzidine and substituted benzidines in a chemical plant. (*Arch. of Indust. Hyg. and Occupat. Med.*, 1951, **4**, 533-540.)
121. MEIGS (J.W.), SCIARINI (L.J.) et VAN SANDT (W.A.). — Skin penetration by diamines of the benzidine group. (*Arch. of Indust. Hyg. and Occupat. Med.*, 1954, **9**, 122-132.)
122. MEYER (A.) et SILBERSTEIN (L.). — Colorants azoïques dérivés de la 4-hydroxyquinaldine. (*B.S.C.*, 1948, 590-593.)
123. MILLER (E.C.), SANDIN (R.B.), MILLER (J.A.) et RUSCH (H.P.). — The carcinogenicity of compounds related to 2-Acetylaminofluorene, III, Aminobiphenyl and Benzidine Derivatives. (*Cancer Research*, 1956, **16**, 525-534.)
124. MULLER (A.). — Primary papilloma of the ureter after benzidine injury. (*Zbl. Gewbyg.*, 1940, **27**, 129; in *C.A.*, 1942, **36**, 3579/8.)
125. MULLER (A.). — Occupational disease of the bladder in the industrial Area of Basle. (*Proc. 9th Intern. Congr. Ind. Med.*, London, 1948, 492-496.)
126. NASSAUER (M.). — Über bösartige Blasengeschwülste bei Arbeitern der organisch. Chemischen Grossindustrie. (*Z. Angew. Chem.*, 1919, **32**, 333-335.)
127. NEISH (W.J.P.). — On the solubilisation of aromatic amines by purines. (*Rec. Trav. Chim.*, 1948, **67**, 361-373.)
128. NEUBERG (C.) et SCHUCHARDT (W.). — Weiteres über kristallisierte und gelatinöse salze der Phosphoglycerinsäuren. (*Biochem. Z.*, 1935, **280**, 293-296.)
129. OPPENHEIMER (R.). — Über die bei Arbeitern chemischen Betriebe beobachteten Geschwülste des Harnapparates und deren Beziehungen zur allgemeinen Geschwulstpathogenese. (*Münch. Med. Woch.*, 1920, **76**, 12-14.)
130. OWEN (E.C.). — Determination of sulfate. A study of the conditions necessary for the precipitation of benzidine sulfate with special reference to the estimation of sulfates in urine. (*Biochem. J.*, 1936, **30**, 352-360.)

131. PAOLINI (I. DE). — Su una nuova reazione cromatica delle amine aromatiche. (*Gazz. Chim. Ital.*, 1930, **60**, 859-862.)
132. PERLMANN (S.) et STAEHLER (W.). — Zur « Ätiologie der Blasengeschwülste ». (*Ztsch. Urol. Chir.*, 1932, **36**, 139.)
133. PLETISHER (A.), THOELEN (H.) et RICHTERICH (R.). — Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung aromatischer Amine. (*Helv. Physiol. et Pharmacol. Acta*, 1953, **11**, 171-181.)
134. POTTER (V.R.) et ELVEHJEM (C.A.). — A modified method for the study of tissue oxidation. (*J. Biol. Chem.*, 1936, **114**, 495-504.)
135. POWER (M.H.) et WAKEFIELD (E.G.). — A volumetric benzidine method for the determination of inorganic and ethereal sulfate in serum. (*J. Biol. Chem.*, 1938, **123**, 665-667.)
136. RASCANU (R.). — Composés moléculaires de l'acide picrique. (*Ann. Sci. Univ. Jassy*, 1939, **25**, 395-423.)
137. RAY (F.E.), GRYDER (J.M.) et ARGUS (M.F.). — Excretion and distribution in the tissues of Rats and Guinea Pigs of carcinogenic and non carcinogenic amines. (*Prof. of Amer. Assoc. for Cancer Research*, 1954, **1**, 39-40.)
138. RAY (F.E.) et SOFFER (L.). — Compounds for cancer research. V, Radioactive sulfonamides. (*J. Org. Chem.*, 1950, **15**, 1037-1042.)
139. REHN (L.). — Blasengeschwülste bei Fuchsinarbeitern. (*Arch. Klin. Chir.*, 1895, **50**, 588-600.)
140. RUDALI (G.), CHALVET (H.) et WINTERNYTZ (F.). — Cancérisation de la vessie à l'aide de phénazines chez des rats. (*C.R. Acad. Sci.*, 1955, n° 17, **240**, 1738-1740.)
141. RUZICKA (W.). — Jod in statu nascendi zum Nachweis einiger primärer aromatischer Amine. (*Z. Anal. Chem.*, 1930, **80**, 185-190.)
142. SACHS (F.). — Ueber die Umlagerung von Hydrazobenzol in Benzidine durch Eisessig. (*Ber.*, 1902, **35**, 1433-1435.) Cf. également BULOW (C.) et VON REDEN (U.). — Beiträge zur Kenntniss der 3.8.Diamido diphenyl-2-9-dicarbonsäure (3.8.Diamido-2-9-Diphen-säure, O-Diamido-diphen-säure, Benzidin-O-dicarbonsäure). (*Ber.*, 1898, **31**, 2574-2582.)
143. SAH (P.P.T.). — β naphthazide as a reagent for the identification of primary and secondary amines. (*J. Chinese Chem. Soc.*, 1937, **5**, 100-106.)
144. SAH (P.P.T.) et CHUNG-HOU-TIEN. — 3,5 dinitro-o-toluic-acid as a reagent for the identification of amines. (*J. Chinese Chem. Soc.*, 1936, **4**, 490-495.)
145. SAH (P.P.T.) et KWEI-HUNG-YUIN. — 3,5 dinitro-p-toluic acid as a reagent for the identification of amines. (*J. Chinese Chem. Soc.*, 1937, **5**, 129-133.)

146. SÁNCHEZ (J.A.). — A new color reaction of cyclic primary amines and its analytical application. (*Anal. Asoc. Quim. Argentina*, 1925, 23, 431-439; in *C.A.*, 1926, 20, 2300.)
147. SAVITT (S.A.) et OTHMER (D.F.). — Separation of m. and p. crésols from their mixtures. (*Ind. Eng. Chem.*, 1952, 44, 2428-2431.)
148. SAX (I.). — Handbook of dangerous materials. (« Reinhold Publishing Corporation », 330 West Forty-Second St, New York 18, 1951.)
149. SCHAR (W.). — Experimentelle Erzeugung von Blasentumoren (Die Wirkung langdauernden Inhalationen von aromatischen Amidverbindungen). (*Dtsch. Ztsch. Chir.*, 1930, 226, 81-86.)
150. SCHMIDT (H.) et SCHULTZ (G.). — Ueber Benzidin. (*Ann.*, 1881, 207, 320-347.)
151. SCHOORL (N.). — Eine neue Reaktion auf Benzidin. (*Chem. Zentr.*, 1941, 2, 2357.)
152. SCHRENK (W.) et KNORR (A.). — Quinoid biphenyl derivatives. (*Ann. Chem.*, 1908, 363, 313.)
153. SCOTT (T.S.). — The incidence of bladder tumors in a dye factory. (*Brit. J. Ind. Med.*, 1952, 9, 127-132.)
154. SCOTT (T.S.) et WILLIAMS (M.H.C.). — The control of industrial tumours. (*Brit. J. Ind. Med.*, 1957, 14, 150-163.)
155. SHIMONURA (A.). — Action of acid anhydrides on Benzidine. (*Mem. Coll. Sci. Kyoto Imp. Univ.*, 1925, 8, 19-33.)
156. SIMON (A.) et REETZ (J.H.). — Zur Frage der Eisenaktivität die Benzidinreaktion. (*Z. Anorg. Allgem. Chem.*, 1930, 194, 89-112.)
157. SIRCAR (A.C.) et SEN-GUPTA (P.R.). — The constitution of monophthalylbenzidines. (*J. Indian Chem. Soc.*, 1928, 5, 397-399.)
158. SMITH (E.F.). — Behavior of organic bases toward soluble tungstates. (*Proc. Am. Phil. Soc.*, Supplément, 1926, 65, 7-10.)
159. SPITZ (S.), MAGUIGAN (W.H.) et DOBRINER (K.). — The carcinogenic action of benzidine. (*Cancer*, 1950, 3, 789-804.) Cf. également SPITZ (S.). — Communication personnelle, citée par WALPOLE (A.C.). — *Brit. J. Ind. Med.*, 1954, 11, 105-109.
160. STEINMETZ (H.). — Chemisch-Kristallographische Notizen. (*Z. Krist.*, 1921, 56, 157-166.)
161. TAKEO UEDA, SHIGESHI TOYOSHIMA, SHIN-YA ITO et TAKOO KOSUGE. — Chemotherapeutic drugs against virus. II, Action of naphthionic acid and its analogous compounds against Japanese encephalitis virus. (*J. Pharm. Soc. Japan*, 1951, 71, 972-974.)
162. TRÉFOUEL (M.). — Les sulfamides, chimie et pharmacologie. (*Bull. Ac. Méd.*, 1941, 124, 546-554.)

163. TRUHAUT (R.). — Contribution à l'étude des facteurs chimiques de cancérisation. (*Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie*, Paris, 1947.)
164. TRUHAUT (R.). — Contribution à l'étude des cancers professionnels. Les cancérogènes vésicaux. (*La Semaine des Hôpitaux de Paris*, 25^e année, n° 75, 10 octobre 1949.)
165. TRUHAUT (R.). — Les effets biologiques du thallium. Etude analytique, biochimique, pharmacodynamique et toxicologique. (*Thèse de Doctorat ès Sciences*, 1952.)
166. TRUHAUT (R.). — Transformation métabolique des toxiques organiques. Intérêt de leur étude. (*Ann. Pharm. Franç.*, 1953, **11**, 46-78.)
167. TRUHAUT (R.). — Les substances chimiques, agents de cancers professionnels. (*Arch. Mal. Prof.*, 1954, **15**, 431-467.)
168. TRUHAUT (R.). — Sur l'action cancérogène de certaines matières colorantes. Importance en hygiène alimentaire, en thérapeutique et en hygiène générale. (*Ann. Pharm. Franç.*, 1955, **13**, 1-40.)
169. TRUHAUT (R.) et LOISILLIER (F.). — Résultat cité par TRUHAUT (R.) dans « Les substances chimiques, agents de cancers professionnels ». (*Arch. Mal. Prof.*, 1954, **15**, 431-467.)
170. TURNER (E.E.) et DENNETT (H.G.). — Orientation effects in the diphenyl series: (*J. Chem. Soc.*, London, 1926, 476-481.) Cf. également TURNER (E.E.) et WOOD (R.J.). — The space formula of diphenyl. (*J. Chem. Soc.*, London, 1926, 2476-2484.)
171. TWOMBLY (G.H.). — Communication présentée au VI^e Congrès Intern. du Cancer, Sao-Paulo, juillet 1954.
172. UEBELIN (F.) et PLETSCHER (A.). — « Aetiologie und Prophylaxie gewerblichen Tumoren in der Farbstoffindustrie. » (*Schweiz. Med. Wschr.*, 1954, **84**, 917-920.)
173. VARTANYAN (A.T.). — Quenching of the fluorescence and the photo-thermal decomposition of aniline. (*J. Phys. Chem.*, U.R.S.S., 1938, **12**, 308-325.)
174. VELEY (V.H.). — The affinity constants of bases as determined by the aid of methyl-orange. (*J. Chem. Soc.*, London, 1908, **93**, 2122-2144.)
175. VLEZENBEEK (H.J.). — Eine Reaktion auf Hydrochinon und auf Benzinidin. (*Chem. Zentr.*, 1942, **1**, 1786.)
176. VONESH (E.) et VELASCO (P.). — El 1-2 naftoquinon 4 sulfanato de sodio como reactivo de aminos aromáticas primarias. (*Arch. Farm. Bioquim. Tucuman*, 1944, **1**, 241-245.)
177. VON OETTINGEN (W.F.). — Poisoning. (P.B. Hoeber, Inc. Medical Book Department of Harper and Brothers, 49 East 33d Street, New York 16, 1952, p. 281.)

178. VUKCEVIC-KOVACEVIC (V.) et BICAN-FISTER (T.). — Identification of benzidine. II, Benzidine reactions by means of bromine vapors. (*Farm. Glasnik*, 1951, 7, 457-461; in *C.A.*, 1952, 46, 10537f.)
179. WALD (H.). — Ueber Azoverbindungen des Diphenyls. (*Ber.*, 1877, 10, 137-140.)
180. WATANABE (A.). — The photochemical activation of oxidation by complex metallic salts. (*Iwata Inst. Plant. Biochem. Pub.*, 1936, 2, 129-158; in *C.A.*, 1936, 30, 6650/7.)
181. WATANABE (I.I.) et ICHINOSE (Y.). — Determination of nitrogen group in primary aromatic amines. (*J. Pharm. Soc. Japan*, 1943, 63, 36-40.)
182. WEBER (H.) et HEIDEPRIEM (C.). — Zur Kenntnis des Verhaltens aromatischer Amine im Organismus. (*Ber. Ges. Physiol. Exptl. Pharmacol.*, 1929, 48, 451.)
183. WESTFALL (B.B.). — Estimation of 2-Amino-Fluorene and related compounds in biologic material. (*J. Nat. Cancer Inst.*, 1945, 6, 23-29.)
184. WESTFALL (B.B.) et MORRIS (E.). — Some studies of the excretion of diazotable material after feeding 2 acetyl-amino-fluorene to Rats. (*Cancer Research*, 1950, 10, 506-509.)
185. WHEELER (A.S.) et JENNINGS (E.W. DE). — Reaction between dichloroacetic acid and aromatic amines. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1927, 49, 1091.)
186. WILEY (F.H.). — The metabolism of β Naphtylamine. (*J. Biol. Chem.*, 1938, 124, 627-630.)
187. WILLIS (R.A.). — Pathology of tumours. (Edit. by Butterworth and Co, London, 1948, 473-474.)
188. WOKER (G.). — Die Theorie der Benzidin Oxydation in ihrer Bedeutung für Peroxydase Untersuchungen. (*Ber.*, 1916, 49, 2319-2337.)
189. YANKOVSKII (V.D.) et KRECHETOVA (N.P.). — The agglutinating properties of certain organic compounds in relation to the erythrocytes of human and animal blood (in English). (*J. Med. Ukraine*, 1937, 7, 169-196; in *C.A.*, 1938, 32, 9129/8.)
190. ZININ (N.). — Ueber das Azobenzid und die Nitrobenzinsäure. (*J. Prakt. Chem.*, 1845, 36, 93-107.)
191. ZYLBERSZAC (S.). — Le rôle des composés du diamino-diphényle dans la cirrhose provoquée du foie chez le rat. (*C.R. Soc. Biol.*, 1951, 145, 136-138.)

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
------------------------	---

Première partie

Principales données sur la benzidine

Chapitre premier : GÉNÉRALITÉS SUR LA BENZIDINE	9
Chapitre deuxième : OBTENTION DE LA BENZIDINE	13
— Préparation de l'hydrazobenzène	13
— Préparation proprement dite de la benzidine	13
Chapitre troisième : PROPRIÉTÉS DE LA BENZIDINE	16
— Propriétés physiques et physico-chimiques	16
— Propriétés chimiques et analytiques	17
— Propriétés biologiques de la benzidine	28
Chapitre quatrième : LES EFFETS TOXIQUES DE LA BENZIDINE	30
— Effets toxiques de la benzidine autres que son pouvoir <i>cancérigène</i>	30
— Effets <i>cancérigènes</i> de la benzidine	32
Chapitre cinquième : ÉTUDE DES INTOXICATIONS PAR LA BENZIDINE	39
— Étiologie des intoxications	39
— Voies de pénétration du toxique	41
— Doses toxiques	42
— Formes cliniques des intoxications	46
— Modifications histologiques au niveau de l'épithélium vésical	48
Chapitre sixième : TRAITEMENT ET PRÉVENTION DES INTOXICATIONS PAR LA BENZIDINE	52
— Traitement	52
— Prophylaxie	52
— Législation	55

Deuxième partie

**Méthodes de caractérisation et de dosage de la benzidine
dans les milieux complexes**

Chapitre premier : EXPOSÉ DES MÉTHODES DÉJÀ PROPOSÉES POUR LE DOSAGE OU L'ISOLEMENT DE LA BENZIDINE	59
— <i>Méthodes pondérales</i>	59
— <i>Méthodes colorimétriques</i>	59
— <i>Méthodes chromatographiques</i>	67
Chapitre second : ETABLISSEMENT D'UNE MÉTHODE PERSONNELLE DE DOSAGE DE LA BENZIDINE	72
— <i>Essais préliminaires</i>	72
— <i>Méthode de dosage de la benzidine</i>	73

Troisième partie

**Recherches personnelles sur la répartition de la benzidine
dans l'organisme animal au cours de l'intoxication expérimentale**

Chapitre premier : RÉPARTITION DE LA BENZIDINE DANS L'ORGANISME	83
— <i>Intoxication aiguë</i>	83
— <i>Intoxication subaiguë</i>	87
— <i>Intoxication à long terme dite chronique</i>	91
Chapitre second : ESSAI DE RÉPARTITION DE LA BENZIDINE AU NIVEAU DES PRINCIPALES STRUCTURES DE LA CELLULE HÉPATIQUE	93
— <i>Méthode d'isolement des structures cellulaires</i>	93
— <i>Résultats de notre expérimentation</i>	96

Quatrième partie

Etude de quelques effets biologiques de la benzidine

Chapitre premier : EFFETS DE LA BENZIDINE SUR LES ÉLÉMENTS FIGURÉS DU SANG	101
— <i>Les « corpuscules de Heinz »</i>	101
— <i>Protocole d'expérience</i>	102
— <i>Résultats</i>	103

Chapitre deuxième : ETUDE DE L'ACTION DE LA BENZIDINE SUR LE PIGMENT SANGUIN	107
— <i>Technique de dosage de la méthémoglobine</i>	107
— <i>Expérimentation</i>	108
Chapitre troisième : ETUDE DE L'ACTION DE LA BENZIDINE SUR LA RESPIRATION CELLULAIRE	111
— <i>Technique utilisée</i>	111
— <i>Résultats</i>	112
Chapitre quatrième : MODIFICATIONS HISTOLOGIQUES	116

Cinquième partie

Etude du métabolisme de la benzidine chez les différentes espèces animales. Son rapport avec l'action cancérigène

Chapitre premier : DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES CONCERNANT LE MÉTABOLISME DE LA BENZIDINE	122
— <i>Recherches à prédominance analytique</i>	122
— <i>Recherches à orientation plus spécialement biologique</i>	125
Chapitre deuxième : RECHERCHES PERSONNELLES. PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX. EXPOSÉ DE LA TECHNIQUE CHROMATOGRAPHIQUE UTILISÉE	127
— <i>Préparation du matériel biologique</i>	127
— <i>Matériel chromatographique et réalisation du chromatogramme</i>	128
Chapitre troisième : ETUDE EXPÉRIMENTALE DU MÉTABOLISME DE LA BENZIDINE CHEZ L'ANIMAL. EXPOSÉ ET DISCUSSION DE NOS RÉSULTATS	132
— <i>Etude sur le tissu hépatique</i>	132
— <i>Etude de l'élimination urinaire</i>	134
CONCLUSIONS GENERALES	143
BIBLIOGRAPHIE	149

